

doi:10.11937/bfyy.20181035

南瓜种子无菌苗培养技术研究

武习习, 张恩慧, 程永安, 王改改, 曹丽红, 尹盼盼

(西北农林科技大学 园艺学院, 陕西 杨凌 712100)

摘要:以南瓜“密本”种子为试材,研究种皮处理和种膜处理方式、催芽、培养基琼脂和蔗糖质量浓度对组织培养种子萌发及无菌苗生长情况的影响,分时段分析了各处理种子胚根萌发率、子叶变绿比率、侧根发生率、子叶展开率、第1真叶发生率,测量无菌苗真叶长、真叶宽、茎粗、节间长、植株高度、生长点高度等差异,筛选南瓜无菌苗最佳培养体系,以研究南瓜种子用组织培养方法培育无菌壮苗技术的最佳条件,为南瓜扩繁和遗传转化育种提供支持。结果表明:南瓜种子获取无菌苗的较好处理方式是将种子剥壳、留种膜,琼脂浓度 $5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,无菌苗真叶的分化最早,但无菌苗逐渐出现玻璃化;琼脂浓度 $6\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 或 $8\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,无菌苗的综合性状最优;培养基不加蔗糖,植株萌发期和幼苗前期生长与发育最快,而添加蔗糖 $30\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,植株后期营养生长最旺盛。试验表明,对南瓜无菌种子培养时,将种子剥壳、留种膜,以培养基MS+ $30\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 蔗糖+ $6\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 琼脂为条件最适合培养南瓜无菌苗。

关键词:南瓜;种子;组织培养;萌发;无菌苗

中图分类号:S 642.104⁺.3 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2018)21-0022-08

南瓜(*Cucurbita moschata* (Duch. ex Lam.) Duch. ex Poiret)属葫芦科南瓜属一年生蔓生草本植物,又名饭瓜、番瓜、倭瓜等。南瓜生长强健,对环境适应力极强,在我国各地普遍栽培,是夏秋季鲜菜上市供应的主要蔬菜之一^[1-2]。南瓜花器为单性花,雌雄同株异花,性型具有可塑性^[3]。南瓜品种在我国栽培已由常规品种向杂种一代迅速发展,杂交种具有显著优势^[4]。然而许多南瓜的

优良基因资源尤其是抗性方面不能通过常规育种得到利用^[5-6]。随着现代分子生物学技术的发展,分子育种技术也逐渐应用到南瓜属作物的育种研究上,如转基因抗病育种、质量及数量性状定位等方面^[7-9]。

组织培养技术和培养无菌苗是实现遗传转化方面分子生物学育种的基础^[10-12]。南瓜育种存在授粉不良、结籽不佳等现象,且一些名优南瓜的品种也都需要借助组织培养技术来实现其繁殖或扩大繁殖^[13-14]。但南瓜培养无菌苗的一般种子消毒方法易抑制消毒种子萌发,或影响无菌幼苗茁壮生长,故在一定程度上不利于分子育种及组织培养扩繁的顺利开展^[15]。因此,南瓜种子合理消毒方式确立和无菌苗茁壮培养就成为南瓜种子组织培养研究重点之一。

该试验开展了南瓜种子组织培养技术研究,旨在奠定南瓜再生无菌苗培养的基础,为南瓜分子生物学育种和基因工程育种提供丰富的无菌材

第一作者简介:武习习(1992-),女,安徽宿州人,硕士研究生,研究方向为南瓜单倍体育种技术。E-mail:1204277044@qq.com.

责任作者:程永安(1957-),男,陕西渭南人,本科,研究员,现主要从事南瓜及西葫芦育种技术和品种选育等研究工作。E-mail:yongan27@163.com.

基金项目:国家公益性行业(农业)科研专项经费资助项目(201303112);西北农林科技大学太白试验示范站资助项目(2017-32)。

收稿日期:2018-06-07

料创造条件。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试南瓜品种“密本”由西北农林科技大学园艺学院南瓜育种课题组提供。获得种子后挑选籽粒饱满,表面色泽光亮、无创伤、大小一致的优质种粒进行试验。

1.2 试验方法

1.2.1 无菌苗的获得

选取饱满、大小一致的南瓜种子用温水(55°C)浸泡 10 min,浸泡时用玻璃棒不断搅拌,以体积分数 75% 酒精表面消毒 60 s 后,置 $1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 氯化汞溶液中消毒 9 min,常规消毒所用培养基 pH 5.8,培养条件为光照时间 $14\text{ h}\cdot\text{d}^{-1}$ 、光照强度 $3\,000\text{ lx}$ 、温度 $(26\pm 1)^{\circ}\text{C}$,各种种子均培养于 220 mL 组织培养瓶中。

浸种前去种皮处理:种子去壳用常规方式消毒后,用无菌水冲洗 4~5 次,然后用无菌水浸种 6 h,无菌条件下接种于 $\text{MS}+30\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 蔗糖 + $6\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 琼脂培养基中。浸种后去种皮处理:种子带壳,用无菌水浸种 6 h,去壳用常规方式消毒,然后用无菌水冲洗 4~5 次,无菌条件下接种于 $\text{MS}+30\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 蔗糖 + $6\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 琼脂培养基中。以浸种后去种皮处理作为对照。

培养基不同质量浓度琼脂处理:种子去壳,用常规方式消毒后,用无菌水冲洗 4~5 次,然后用无菌水浸种 6 h,无菌条件下接种于 $\text{MS}+30\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 蔗糖 + 琼脂培养基中,培养基中琼脂质量浓度分别为 5、6、7、8 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

催芽处理:种子去壳,采用 1.2.1 中常规方式消毒后,用无菌水冲洗 4~5 次,然后用无菌水浸种 6 h,无菌条件下接种于 $\text{MS}+30\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 蔗糖 + $6\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 琼脂的培养基中,并催芽(放置在 29°C 黑暗温箱 24 h)。以不催芽种子作为对照。

去种膜处理:种子去壳去膜(用解剖针将种膜挑除掉),用常规方式消毒后,用无菌水冲洗 4~5 次,然后用无菌水浸种 6 h,无菌条件下接种于 $\text{MS}+30\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 蔗糖 + $6\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 琼脂的培养基中。以不去种膜处理种子作为对照。

蔗糖处理:种子去壳,用常规方式消毒后,用

无菌水冲洗 4~5 次,然后用无菌水浸种 6 h,无菌条件下接种于 $\text{MS}+6\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 琼脂培养基中。以培养基中添加 $30\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 蔗糖处理种子作为对照。

1.2.2 南瓜无菌种子萌发及幼苗生长势观察

从播种开始,第 3 天起,观察记录种子萌发的最初情况。每隔 4 d 观察记录 1 次种子萌发及幼苗生长势(即胚根萌发率、侧根发生率、真叶发生率等),并从接种起至第 20 天持续观察有无污染。

1.2.3 无菌植株生物学性状观察

接种 20 d,从组织培养瓶中取出无菌苗,用直尺和游标卡尺测量每个处理植株的生物学性状(即真叶长、真叶宽、茎粗、节间长、植株高度、生长点高度)。

1.3 项目测定

将无菌种子接种于不同处理培养基中,每处理接种 30 个培养瓶,每瓶接种 3 粒种子,设 3 次重复。定期观察每处理的种子萌发和生长发育情况以及无菌植株生物学性状。

胚根萌发率(%) = 生长出肉眼明显可见的胚根的种子数/接种种子数 $\times 100$; 子叶变绿比率(%) = 子叶明显转绿的种子数/接种种子数 $\times 100$; 侧根发生率(%) = 生长出肉眼明显可见的侧根的种子数/接种种子数 $\times 100$; 子叶展开率(%) = 子叶充分展开的种子数/接种种子数 $\times 100$; 第 1 真叶发生率(%) = 长出第 1 片真叶的种子数/接种种子数 $\times 100$; 第 1 真叶长度(cm):除叶柄以外叶片最大长度,简称叶长;第 1 真叶宽度(mm):叶片最宽处的宽度,简称叶宽;茎粗(mm):子叶与第 1 片真叶之间的茎粗;节间长(cm):幼苗第 1 片真叶与第 2 片真叶之间的长度差;植株高度(cm):植株被移出培养瓶后被拉直(但注意动作轻缓不要拉断),其最高点到茎基之间的高度;生长点高度(cm):植株生长点到茎基之间的高度。

1.4 数据分析

将不同质量浓度琼脂处理的种子各组百分数据转化为反正弦值后,进行方差分析和 Duncan's 多重比较。将其余各处理百分数据统计平均值,做出柱形图进行比较。将植株叶长、叶宽、茎粗、植株高度、生长点高度的数据进行方差分析和

Duncan's 多重比较。

2 结果与分析

2.1 南瓜无菌种子萌发及生长势差异分析

2.1.1 浸种前后去种皮效果比较

由表 1 可以看出,种子浸种前去种皮在一定时间内显著性的影响南瓜种子萌发和幼苗生长势。胚根萌发率浸种前去种皮和浸种后去种皮二者相差不显著,而子叶变绿比率、侧根发生率和子叶展开率,浸种前去种皮比浸种后去种皮分别在第 7、9、19 天呈现极显著性高,但随着时间延长 2 个处理间又表现无差异;第 7 天子叶转绿比率浸种前去种皮的处理明显比先浸种后去种皮的效

果好,前者的 80.0%显著高于后者的 26.7%;而二者差异随时间变化在缩小,到第 11 天,差异不显著。到第 9 天,部分种子已经长出肉眼可见的侧根,浸种后去种皮的种子侧根发生率为 11.1%,明显少于浸种前去种皮的 46.7%,二者差异也随时间变化在缩小,到第 15 天后差异不显著。子叶展开率第 15 天和第 19 天均表现出浸种前去种皮比浸种后去种皮显著性的高。第 1 片真叶发生率呈现结果相反,浸种前去种皮前期比较低,而后期反而高,二者均存在显著或极显著性差异。浸种前后去种皮均未造成污染。由此表明,南瓜子叶展开期前培养健壮无菌苗选用浸种前去种皮比浸种后去种皮培养效果更好。

表 1 浸种前后去种皮处理无菌种子萌发及生长差异表现

Table 1 Differences between seeds peeled off the seed skin before and after soaked in terms of germination and growth

处理 Treatment	胚根萌发率 Radicle rate/%		侧根发生率 Lateral roots rate/%			子叶变绿比率 Ratio of cotyledon turning green/%		子叶展开率 Cotyledon expansion rate/%		第 1 真叶发生率 First main leaf rate/%	
	3 d	7 d	9 d	15 d	19 d	7 d	11 d	15 d	19 d	15 d	19 d
浸种后(CK) After soaked	74.4aA	90.0aA	11.1bB	83.3aA	90.0aA	26.7bB	88.9aA	64.4bB	67.8bB	62.2aA	63.3bB
浸种前 Before soaked	82.2aA	90.0aA	46.7aA	84.4aA	84.4aA	80.0aA	83.3aA	78.9aA	81.1aA	50.0bA	83.3aA

注:同列不同大写字母表示在 0.01 水平上差异显著,小写字母表示在 0.05 水平上差异显著,下同。
Note: Different capital letters in the same column represent significant difference at 0.01 level and different lowercase letters in the same column represent significant difference at 0.05 level. The same below.

2.1.2 培养基中添加不同质量浓度琼脂影响效果比较

由表 2 可知,在培养基中添加 4 种浓度琼脂从根系生长分析,胚根萌发率和侧根发生率琼脂质量浓度在 5 g · L⁻¹ 与 8 g · L⁻¹ 间差异不显著,除第 9 天侧根发生率分别为 64.4%和 63.3%外,其它时间均为 100.0%;而二者与 6 g · L⁻¹ 和 7 g · L⁻¹ 间均呈极显著性差异;从子叶生长分析,生长前期 5 g · L⁻¹ 琼脂质量浓度均比其它 3 种浓度生长速度快,而在后期除与 6 g · L⁻¹ 琼脂质量浓度存在差异显著外,与其它浓度均无显著差异,比率几乎接近或达到 100.0%;培养基中添加 4 种浓度琼脂均出现污染。由此表明,培养基中添加 5 g · L⁻¹ 或 8 g · L⁻¹ 琼脂均有利于培养南

瓜子叶展开期前的健壮无菌苗。

2.1.3 种子催芽影响效果比较

由表 3 可以看出,催芽与否不影响无菌苗培养中主根萌发率,而显著性的影响着侧根发生率,催芽促进着侧根生长,比未催芽的对照在第 9 天和第 19 天分别高出 15.5 个百分点和 15.6 个百分点。催芽与对照相比,更有利子叶萌发和快速生长,催芽的子叶变绿比率、子叶展开率和第 1 真叶发生率极显著高于对照,分别在第 11 天、第 15 天及第 19 天其比率均达到 100.0%,而对应的对照在 80%左右。催芽未发生污染。由此表明,培养南瓜健壮无菌苗种子催芽比不催芽效果更显著。

表 2 培养基中不同质量浓度琼脂处理种子萌发及生长差异表现
Table 2 Differences of seed germination and growth among different agar concentration treatments

琼脂质量浓度 Agar concentration /(g · L ⁻¹)	胚根萌发率		侧根发生率			子叶变绿比率		子叶展开率		第 1 真叶发生率	
	Radicle rate/%		Lateral roots rate/%			Ratio of cotyledon turning green/%		Cotyledon expansion rate/%		First main leaf rate/%	
	3 d	7 d	9 d	15 d	19 d	7 d	11 d	15 d	19 d	15 d	19 d
5	100. 0aA	100. 0aA	64. 4aA	100. 0aA	100. 0aA	100. 0aA	100. 0aA	100. 0aA	100. 0aA	92. 2aA	100. 0aA
6	82. 2cC	90. 0bB	46. 7bB	84. 4cC	84. 4bB	80. 0bB	83. 3bB	78. 9bB	81. 1bB	50. 0cC	83. 3bB
7	91. 1bB	100. 0aA	47. 8bB	90. 0bB	100. 0aA	83. 3bB	100. 0aA	72. 2cC	100. 0aA	74. 4bB	100. 0aA
8	100. 0aA	100. 0aA	63. 3aA	100. 0aA	100. 0aA	82. 2bB	100. 0aA	74. 4cBC	100. 0aA	73. 3bB	100. 0aA

表 3 催芽处理对无菌种子萌发及生长的影响
Table 3 Effect of pregermination seed germination and growth

处理 Treatment	胚根萌发率		侧根发生率			子叶变绿比率		子叶展开率		第 1 真叶发生率	
	Radicle rate/%		Lateral roots rate/%			Ratio of cotyledon turning green/%		Cotyledon expansion rate/%		First main leaf rate/%	
	3 d	7 d	9 d	15 d	19 d	7 d	11 d	15 d	19 d	15 d	19 d
不催芽(CK) No pregermination	82. 2aA	90. 0aA	46. 7bA	84. 4aA	84. 4bB	80. 0aA	83. 3bB	78. 9bB	81. 1bB	50. 0bB	83. 3bB
催芽 Pregermination	91. 1aA	91. 1aA	62. 2aA	82. 2aA	100. 0aA	83. 3aA	100. 0aA	100. 0aA	100. 0aA	90. 0aA	100. 0aA

2. 1. 4 去种膜对无菌培养种子萌发和生长影响

由表 4 可知,南瓜种子培养无菌苗,去种膜仅有利于子叶展开,而其它各方面除部分子叶变绿以外均显著受到抑制。接种后第 7 天,仍未见有胚根萌发,到第 19 天,侧根仍未发生。且真叶在

接种第 15 天前还未分化,到第 19 天胚根萌发率和真叶分化率极低,仅为 10. 0%。各处理污染率均为 0。由此表明,去种膜后消毒浸种对南瓜种子有严重的损伤,抑制其萌发及成苗。

表 4 去种膜处理对无菌种子萌发及生长的影响
Table 4 Effect of peeling off the seed membrane on seed germination and growth

处理 Treatment	胚根萌发率			侧根发生率			子叶变绿比率		子叶展开率		第 1 真叶发生率	
	Radicle rate/%			Lateral roots rate/%			Ratio of cotyledon turning green/%		Cotyledon expansion rate/%		First main leaf rate/%	
	3 d	7 d	19d	9 d	15 d	19 d	7 d	11 d	15 d	19 d	15 d	19 d
未去种膜(CK) Seed membrane on	82. 2aA	90. 0aA	100. 0aA	46. 7aA	84. 4aA	84. 4aA	80. 0bA	83. 3bA	78. 9bB	81. 1bB	50. 0aA	83. 3aA
去种膜 Seed membrane off	0. 0bB	0. 0bB	10. 0bB	0. 0bB	0. 0bB	0. 0bB	64. 4aA	64. 4aA	100. 0aA	100. 0aA	0. 0bB	10. 0bB

2. 1. 5 培养基中有无蔗糖影响效果比较

由表 5 可知,培养基中添加 30 g · L⁻¹ 蔗糖和无添加蔗糖,南瓜无菌苗培养时衡量种子萌发

和生长等 5 项性状指标,无蔗糖极显著高于添加 30 g · L⁻¹ 蔗糖。无蔗糖除第 9 天侧根发生率为 67. 8%和第 15 天第 1 真叶发生率为 90. 0%之

表5 蔗糖处理种子萌发及生长情况
Table 5 Germination and growth of seeds of sucrose treatment

蔗糖浓度 Sucrose concentration /(g·L ⁻¹)	胚根萌发率		侧根发生率			子叶变绿比率		子叶展开率		第1真叶发生率	
	Radicle rate/%		Lateral roots rate/%			Ratio of cotyledon turning green/%		Cotyledon expansion rate/%		First main leaf rate/%	
	3 d	7 d	9 d	15 d	19 d	7 d	11 d	15 d	19 d	15 d	19 d
30	82.2bB	90.0bB	46.7bA	84.4bB	84.4bB	80.0bB	83.3bB	78.9bB	81.1bB	50.0bB	83.3bB
0	100.0aA	100.0aA	67.8aA	100.0aA	100.0aA	100.0aA	100.0aA	100.0aA	100.0aA	90.0aA	100.0aA

外,其余各比率指标均达到100%。并且培养基中有无蔗糖均没有出现无菌苗污染。由此表明,南瓜无菌苗子叶展开期前最好选用无蔗糖培养基有利于无菌苗培养。

2.2 南瓜无菌种子再生植株生物学性状差异分析

2.2.1 浸种前后去种皮影响植株性状差异比较

由表6可知,南瓜培养无菌苗选用浸种前或

浸种后不同方式去种皮处理,对无菌植株生物学性状具有很大影响,种皮浸种前去比浸种后去除节间长性状差异不显著外,其它5个性状差异均达极显著性差异,尤其植株高度和生长点高度比浸种后去种皮的处理分别高出39.2%和41.0%。结果表明,培养南瓜无菌苗,采用浸种前去种皮比浸种后去种皮生长的无菌植株更健壮,发育更快。

表6 浸种前后种皮处理无菌植株生物学性状表现结果
Table 6 Plant characteristics of seeds peeled off the seed skin before and after soaked

处理 Treatment	叶长 Leaf blade length/cm	叶宽 Leaf blade width/mm	茎粗 Leaf blade coarseness/mm	节间长 Internode length/cm	植株高度 Plant height /cm	生长点高度 Growing point height/cm
浸种前 Before soaked	3.68aA	41.70aA	3.89aA	1.11aA	10.61aA	5.02aA
浸种后 After soaked	2.95bB	32.81bB	3.33bB	1.14aA	7.62bB	3.56bB
(浸种前—浸种后)/浸种后/%	24.7	27.1	16.8	-2.6	39.2	41.0

2.2.2 培养基中琼脂质量浓度影响植株性状差异比较

由表7可知,不同质量浓度琼脂处理的植株除了在叶长和叶宽方面无显著差别,在其余各项指标中均表现出显著差别。茎粗以8 g·L⁻¹和6 g·L⁻¹琼脂处理浓度最粗,为3.95 mm和3.89 mm,其次是5 g·L⁻¹,最小的是7 g·L⁻¹,为3.53 mm。节间长以6 g·L⁻¹植株的较小,为1.16 cm,其余3个处理均超过1.40 cm。在最大植株高度各处理植株表现出显著差异,以6 g·L⁻¹处理浓度最高为10.61 cm,其次是8 g·L⁻¹,再次是5 g·L⁻¹,最矮的7 g·L⁻¹为8.54 cm。在生长点高度指标上以7 g·L⁻¹浓度处理的植株最矮,为4.23 cm,而其余3个处理之间差异不显著,均在5.00 cm左右。结果表明,不论从茎粗、最大植株高度还是生长点高度方面,7 g·L⁻¹均是最小,当琼脂质量浓度设置为

7 g·L⁻¹时,植株长势最不旺盛,而6 g·L⁻¹无菌幼苗综合性状最好,8 g·L⁻¹次之。在观察中发现,5 g·L⁻¹琼脂的植株出现了明显的玻璃化现象,根系浸泡在未完全凝固的培养基中,叶片呈现半透明状态。故MS+30 g·L⁻¹蔗糖+6 g·L⁻¹琼脂是培养无菌南瓜最适添加琼脂培养基。

2.2.3 培养基中蔗糖有无影响植株性状差异比较

由表8可知,蔗糖30 g·L⁻¹与无蔗糖相比,除茎粗与生长点高度无显著区别外,其余各项指标均是前者明显更大,尤其以叶片长宽和节间长最明显,前者叶长3.68 cm,比后者高出27.3%,前者叶宽41.70 mm,比后者宽36.7%,前者节间长1.11 cm,比后者长63.2%。结果表明,MS培养基中添加30 g·L⁻¹的蔗糖是有利于幼苗叶片的增大和茎的伸长,有利于植株后期的营养生长。

表 7 培养基中不同质量浓度琼脂影响无菌植株性状表现结果
Table 7 Plant characteristics of different agar concentration treatments

琼脂质量浓度 Agar concentration /(g · L ⁻¹)	叶长 Leaf blade length/cm	叶宽 Leaf blade width/mm	茎粗 Leaf blade coarseness/mm	节间长 Internode length/cm	植株高度 Plant height /cm	生长点高度 Growing point height/cm
5	3.74aA	38.51aA	3.82bB	1.54aA	9.07cB	5.14aA
6	3.68aA	41.70aA	3.89aA	1.16bB	10.61aA	5.02aA
7	3.62aA	39.29aA	3.53cC	1.41aA	8.54dC	4.23bB
8	3.44aA	42.41aA	3.95aA	1.58aA	9.57bB	4.98aA

表 8 培养基中有无蔗糖影响南瓜无菌植株性状表现结果
Table 8 Plant characteristics of culture with sucrose and without sucrose

蔗糖浓度 Sucrose concentration /(g · L ⁻¹)	叶长 Leaf blade length/cm	叶宽 Leaf blade width/mm	茎粗 Leaf blade coarseness/mm	节间长 Internode length/cm	植株高度 Plant height /cm	生长点高度 Growing point height/cm
30	3.68aA	41.70aA	3.89aA	1.11aA	10.61aA	5.02aA
0	2.89bB	30.51bB	3.75aA	0.68bB	8.50bB	4.65aA
(加蔗糖-无蔗糖)/无蔗糖/%	27.3	36.7	3.7	63.2	24.8	8.0

2.2.4 催芽与否影响植株性状差异比较

由表 9 可知,黑暗催芽处理与不催芽对照相比,植株的生长点高度差异不显著,其它各指标均存在显著或极显著差别,其中相对差距最大的是株高,为 17.0%,差距最小的是生长点高度,

为-1.8%。黑暗催芽培养的植株叶长、叶宽、茎粗、最大植株高度均较小,节间长较大,由此表明,南瓜培养无菌植株时不催芽比催芽的效果更好,植株更健壮。

表 9 催芽影响南瓜无菌植株性状表现结果
Table 9 Plant characteristics of treatment of pregermination treatment

处理 Treatment	叶长 Leaf blade length/cm	叶宽 Leaf blade width/mm	茎粗 Leaf blade coarseness/mm	节间长 Internode length/cm	植株高度 Plant height /cm	生长点高度 Growing point height/cm
不催芽(CK) No pregermination	3.68aA	41.70aA	3.89aA	1.11bA	10.61aA	5.02aA
催芽 Pregermination	3.19bB	39.86bA	3.55bB	1.21aA	9.07bA	5.11aA
(不催芽-催芽)/催芽/%	15.4	4.6	10.0	-8.3	17.0	-1.8

3 讨论

不同植株耐受升汞毒性的能力不同,RAO 等^[16]采用 0.1%升汞对棉花种子消毒 20 min 也无伤害,而解继红等^[17]发现,在对鹅观草属种子消毒时,0.1%升汞消毒 3 min 效果最好。该试验证明,0.1%升汞对只去种皮的“密本”南瓜种子消毒 9 min,萌发情况良好,植株生长健壮,而 0.1%升汞消毒 9 min 对同时剥除种皮和种膜的“密本”南瓜种子有严重的毒害,使其根系萌发受阻,子叶几乎不生长,真叶的生长依赖培养基中的营养,而侧根却未发生,因此,南瓜种子消毒时应剥除种

皮,保留种膜。

侯义龙^[18]认为,一般培养基的琼脂质量浓度用量在 5~10 g · L⁻¹。董飞等^[19]在组织培养大葱种子时使用琼脂质量浓度为 9 g · L⁻¹,王亦菲等^[20]在组织培养花椰菜种子时使用琼脂质量浓度为 6 g · L⁻¹,马继琼等^[21]在组织培养魔芋种子时使用琼脂质量浓度为 5.5 g · L⁻¹,杨文文等^[22]在组织培养苋菜种子时使用琼脂质量浓度为 7 g · L⁻¹。琼脂质量浓度的高低影响培养基中的氧浓度,氧浓度和植物细胞的分化方向有关,KESSEL 和 CARR(1972)在对胡萝卜细胞悬浮培养时发现,当培养基中氧浓度低于临界水平时,有利于形成胚状体;而氧浓度高于临界水平,则有

利于根的形成。早在1939年,WHITE就观察到烟草愈伤组织,由固体培养基转到液体培养基便分化出苗^[23]。该试验发现,琼脂质量浓度低至 $5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,子叶生长转绿最快,结合上述前人研究结果,分析其原因可能是,琼脂质量浓度低,种子以较快速度膨胀,突破种膜并在膨压的作用下使得子叶展开,而较低的琼脂质量浓度给培养基造成低溶氧量的状态,低溶氧量利于芽的分化,使得植株比其它处理的更早进行真叶的分化。琼脂浓度为 $5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,萌发和幼苗生长速度最快。然而随着幼苗长得越来越大,植株出现了严重的玻璃化。琼脂浓度为 $6\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,前期侧根及子叶生长最慢,而无菌苗的综合性状最优。

不同研究者对不同植物种子组培采用的蔗糖质量浓度不一样,然而很少有人系统研究蔗糖对种子萌发及幼苗生长的影响。董飞等^[19]在组织培养大葱种子及杨文文等^[22]在组织培养苋菜种子时使用蔗糖质量浓度为 $30\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。李贞霞等^[15]研究认为,南瓜种子在 0.8% 的琼脂培养基中比在含有蔗糖和MS营养元素的MS培养基中长出南瓜无菌苗的速度更快。该试验从种子萌发及分化期与营养生长时期的生理指标2个层面分析了蔗糖对南瓜种子培养的影响,并且发现,培养基不加蔗糖,植株萌发期和幼苗前期生长与发育最快,而添加蔗糖 $30\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,植株后期营养生长最旺盛。

程永安^[24]认为,南瓜种子经过浸种后,置于 $27\sim 30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下催芽,经36 h左右便开始出芽。张振超等^[25]在组培接种青花菜种子后先暗处理7 d。该试验中,黑暗催芽处理比对照在种子发芽阶段萌发更快,但在20 d幼苗生理指标上却并不比对照好,原因有待进一步研究。张玉园等^[26]在用去皮的南瓜种子经酒精消毒及 $1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 升汞消毒9 min,放在无菌水和滤纸上催芽后接种到MS培养基,污染率是 4.1% ,该试验将种子直接放在培养基中催芽,无污染率。

4 结论

外植体获得良好的生理状态不仅能为遗传转化提供优良载体,而且可供南瓜其它外植体培养例如花、叶、花药、花粉以及未授粉胚珠的组织培养提供参考,试验表明,获得南瓜无菌植株的最佳

方式是去壳保留种膜,用 75% 酒精表面消毒30 s,然后用 0.1% 的氯化汞溶液消毒9 min,无菌水冲洗4~5次,然后用无菌水浸种6 h,胚根垂直向下插入培养基。经过这样处理的外植体诱导无菌苗的经查无污染且不受毒害,发育较快。南瓜种子的发芽情况及植株发育效果与培养基的琼脂质量浓度和蔗糖质量浓度相关。培养基的琼脂质量浓度设为 $6\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 对南瓜种子植株性状的综合表现更好。 $\text{MS}+30\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 蔗糖+ $6\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 琼脂培养基最适合培养南瓜无菌植株。

参考文献

- [1] 任立伟. 如何科学栽培南瓜[M]. 呼和浩特: 远方出版社, 2009.
- [2] 陆幅一. 瓜类蔬菜周年生产技术[M]. 北京: 金盾出版社, 2003.
- [3] 刘宜生, 吴肇志, 王长林. 冬瓜、南瓜、苦瓜高产栽培修订版[M]. 北京: 金盾出版社, 2007: 74-75.
- [4] 徐东辉, 崔崇士, 张耀伟. 南瓜优势育种及遗传规律的研究进展[J]. 东北农业大学学报, 2004(5): 612-615.
- [5] 徐恒戡. 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.
- [6] 龙荣华, 马钧, 肖植文, 等. 浅议云南南瓜杂交育种前景[J]. 北方园艺, 2008(2): 65-66.
- [7] 葛宇, 韩文昊, 刘大伟. 南瓜属作物育种研究回顾和展望[J]. 中国蔬菜, 2016(4): 12-21.
- [8] 李长生, 赵传志, 李爱芹, 等. 黑籽南瓜离体再生体系与转基因技术研究[J]. 山东农业科学, 2009(7): 8-11.
- [9] 闫世江, 张继宁, 刘洁. 生物技术在南瓜育种中的应用[J]. 蔬菜, 2011(2): 45-47.
- [10] 张科. 南瓜韧皮部特异启动子 dENP 在转基因马铃薯中的表达特征[D]. 大庆: 黑龙江八一农垦大学, 2005.
- [11] 毛莲香. 香蕉胚性细胞悬浮系再生体系的优化和转基因研究[D]. 广州: 华南农业大学, 2011.
- [12] 付洪冰, 崔崇士, 赵曦, 等. 农杆菌介导南瓜遗传转化体系的建立[J]. 植物学报, 2010(4): 472-478.
- [13] 贾文庆, 刘宇, 唐米米. 观赏南瓜的组织培养和快速繁殖[J]. 江苏农业科学, 2007(1): 91-93.
- [14] 邹建, 宋明, 汤青林, 等. 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(4): 297-299.
- [15] 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.
- [16] RAO A Q, HUSSAIN S S, SHAHZAD M S, et al. Somatic embryogenesis in wild relatives of cotton (*Gossypium* spp.) [J]. Journal of Zhejiang University Science B, 2006(4): 291-298.
- [17] 解继红, 于靖怡, 陈景芋, 等. 鹅观草属种子消毒及无菌播种的研究[J]. 种子, 2009(3): 25-27.
- [18] 侯义龙. 果树组织培养技术及其应用[M]. 北京: 中国农业

科学技术出版社,2007:22.

[19] 董飞,陈运起,刘世琦,等.种子消毒方法对大葱无菌苗培养的影响[J].中国蔬菜,2011(18):74-76.

[20] 王亦菲,陆瑞菊,陈志伟,等.平阳霉素处理对花椰菜种子萌发和离体茎尖存活的影响[J].上海农业学报,2009(4):14-17.

[21] 马继琼,尹桂芳,孙道旺,等.利用组织培养成芋技术快速构建魔芋杂交品系的探索[J].西南农业学报,2016(6):1398-1403.

[22] 杨文文,刘生财,赖钟雄.苋菜试管开花初探[J].福建农林大学学报(自然科学版),2011(4):360-364.

[23] 陈振光.果树组织培养[M].上海:上海科学技术出版社,1987:27.

[24] 程永安.西葫芦-南瓜高效生产新技术[M].咸阳:西北农林科技大学出版社,2003:27.

[25] 张振超,戴忠良,毛忠良,等.青花菜雄性不育系组培快繁技术研究[J].江苏农业学报,2011(3):680-681.

[26] 张玉园,鲁晓晓,周俊国,等.南瓜子叶节离体再生体系构建[J].江苏农业科学,2015(12):26-29.

Culture Technology for Aseptic Seedling of Pumpkin

WU Xixi,ZHANG Enhui,CHENG Yong'an,WANG Gaigai,CAO Lihong,YIN Panpan
(College of Agriculture,Northwest A & F University,Yangling,Shaanxi 712000)

Abstract: The ‘Miben’ pumpkin seeds were used as materials,the influence of seed skin treatment,the type of membrane treatment,pregermination,the agar and sucrose concentration of culture medium on germination and tissue culture seedling were studied,for which a series of indices such as radicle rate,lateral roots rate,ratio of cotyledon turning green,cotyledon expansion rate and first main leaf rate were analyzed,and differences of leaf blade length,leaf blade width,leaf blade coarseness,internode length,plant height and growing point height were measured to obtain the optimum cultivation system of pumpkin sterile seedling. This best condition of aseptic tissue culture pumpkin seedling cultivation was researched,to provide support for pumpkin breeding. The results showed that,the better way for pumpkin seeds to get aseptic seedlings was to peel the seed shell and preserve seed membrane,the true leaf differentiation appeared the earliest when agar concentration was $5\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,but the plants gradually appeared vitrified;the comprehensive properties of the sterile seedlings were optimal when agar concentration was $6\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ or $8\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$;plant germination as well as seedling early growth and development went the fastest when medium was not added with sugar,plant late vegetative growth was the most exuberant when added with $30\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ sugar. The influence factors of aseptic culture of pumpkin seedlings were discussed,among which pumpkin seeds were peeled with membrane intact and sown in MS medium with $6\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ agar and $30\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ sugar,to provide support for breeding pumpkin propagation and genetic transformation.

Keywords: pumpkin(*Cucurbita moschata*);seed;tissue culture;germination;aseptic seedling