

苦瓜离体快速繁殖技术体系的研究

潘绍坤, 王永清

(四川农业大学林学院园艺学院, 雅安 625014)

摘要:用苦瓜无菌实生苗顶芽及带芽茎段为外植体进行离体快速繁殖技术体系的研究。试验发现, MS培养基附加BA、KT和IBA, 有利于不定芽发生; 适当增加 $\text{NO}_3^- - \text{N}$ 、 $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ 含量, 可提高增值率。在 $\text{MS} + \text{NH}_4\text{NO}_3 20\text{mg/L}$ 、 $\text{KNO}_3 20\text{mg/L} + 0.5\text{mg/LBA} + 0.01\text{mg/LIBA}$ 的培养基中分化率可达到90%, 增值系数最大达到4.8。 AgNO_3 在生根诱导中, 可抑制愈伤组织形成, 在 $1/2\text{MS} + 0.5\text{mg/LBA} + 2.0\text{mg/LAgNO}_3$ 的培养基中生根率为100%, 没有愈伤组织形成, 且主根粗壮、须根多。

关键词: 苦瓜; 离体快繁; 技术体系

中图分类号: S642.503.6

文献标识码: B

文章编号: 1001-0009(2006)04-0148-03

近年来, 苦瓜栽培面积和产量都在不断增加, 对苦瓜优良品种的需求也越来越大, 常造成优良品种种子供不应求, 且价格昂贵。通过组织培养可以达到快速繁殖的目的, 但有关苦瓜组织培养的研究还处于起步阶段, 国外Islam^[1]等进行了苦瓜子叶离体培养研究, 不定芽再生的频率很低。我国也只有少数学者作过初步研究, 苟小平、唐琳用幼叶原生质体培养得到少量愈伤组织^[2]; 申洪业用无菌苗下胚轴为材料诱导出愈伤组织^[3]; 陈放首次从愈伤组织再分化成完整植株^[4]; 唐琳等用顶芽及带芽茎段进行了离体快速繁殖试验^[5]。本试验在前人基础上以顶芽及带芽茎段为外植体, 首次研究了不同N素浓度对苦瓜增殖的影响以及 AgNO_3 对生根的影响, 为建立优良品种高效、实用的离体再生体系打下基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

供试苦瓜品种为“绿人”, 农友种苗股份有限公司提供。

1.2 方 法

1.2.1 无均苗的获得 将成熟的种子剥去种皮, 置于0.1%的升汞消毒8min, 用无菌水冲洗5次, 然后接种于 $\text{MS} + \text{蔗糖} 30\text{g/L} + \text{琼脂} 5.5\text{g/L}$, pH 5.8的固体培养基中。培养温度为 $25 \pm 1^\circ\text{C}$, 光照12h, 光强2000Lx。20d后截取无菌苗顶芽及带芽茎段作为外植体。

1.2.2 不同激素对不定芽诱导的影响 将长度为1cm左右的顶芽或带芽茎段分别接种于不同激素组合的 $\text{MS} + \text{蔗糖} 30\text{g/L} + \text{琼脂} 5.5\text{g/L}$ 的培养基中。激素浓度分别为: 6-BA(0.5、1.0、2.0、3.0mg/L), KT(0.5、1.0mg/L), IBA(0.01、0.03、0.05、0.1、0.5mg/L), NAA(0.02、0.05mg/L)。每个处理为10瓶, 每瓶接种5个材料, 两次重复。

1.2.3 $\text{NO}_3^- - \text{N}$ 和 $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ 对不定芽增殖的影响 将芽丛分切成高度为1cm左右的小苗, 转入不同N源比例的MS附加有1.0mg/L 6^- BA、0.05mg/LIBA培养基中。试验采用二因素三水平完全组合设计, 即: NH_4NO_3 浓度为10、20、30mg/L, KNO_3 浓度为10、20、30mg/L。每个处理为10

瓶, 每瓶接种3个材料, 两次重复。

1.2.4 不同生长素和 AgNO_3 浓度对生根的影响 将生长健壮的苗转入附加有不同浓度生长素及 AgNO_3 的 $1/2\text{MS}$ 培养基中。生长素浓度分别为: IBA、NAA、IAA(0.05、0.10、0.50mg/L), AgNO_3 浓度为1.0、2.0、3.0mg/L。每个处理10瓶, 每瓶接种2个材料, 两次重复。

2 结果与分析

2.1 不同激素组合对苦瓜愈伤组织诱导和不定芽发生的影响

培养一周后, 外植体下部开始膨大, 接着形成愈伤组织。各种激素组合都能形成愈伤组织, 诱导率为100%(表1)。在 $\text{MS} + 3.0\text{mg/LBA} + 0.5\text{mg/LIBA}$ 和 $\text{MS} + 1.0\text{mg/LBA} + 0.05\text{mg/LNAA}$ 两个培养基中愈伤组织为黄色且不定芽再生率和平均增值倍数都为0。在只加入BA和IBA的各处理中(1#-4#), 随着BA、IBA浓度增加且BA/IBA比值降低, 不定芽再生率、平均每苗再生芽数以及平均增值率先增加再降低, 在2#处理中不定芽再生率达到47%, 平均增值数达到2。在加入1.0mg/LBA及不同浓度生长素的各处理中(2#、5#、6#), 只加入0.05mg/LIBA的培养基中(2#), 不定芽再生率、再生芽数、平均增值倍数最高; 加入0.03mg/LIBA和0.02mg/LNAA的培养基中(6#), 不定芽再生率、增值倍数较2#处理降低; 而只加入0.05mg/LNAA的培养基中(5#), 不定芽再生率、增值倍数最低均为0。在BA、KT、IBA三种激素组合的各处理中(7#、8#、9#、10#), 7#、8#、10#处理中生长素浓度均为0.05mg/L, 随着细胞分裂素浓度的增加, 不定芽再生率、增值倍数反而降低; 在7#、9#中细胞分裂素浓度一定, 不定芽再生率、增值倍数随着IBA浓度增加而降低; 比较2#和7#可以看出, 在IBA浓度一定情况下, 附加0.5mg/LBA、0.5mg/LKT的处理中(7#)不定芽再生率、平均增值倍数均高于附加1.0mg/LBA的处理。总的看来, 7#处理即 $\text{MS} + 0.5\text{mg/LBA} + 0.5\text{mg/LKT} + 0.05\text{mg/LIBA}$ 培养基中, 不定芽再生率达到52%, 平均增值倍数为2.15。

表1 激素组合对愈伤组织诱导和不定芽分化的影响

处理号	激素浓度(mg/L)				愈伤组 织大小	愈伤组 织颜色	不定芽再 生率(%)	平均增 殖倍数
	BA	KT	IBA	NAA				
1	0.50		0.01		+	黄绿	40	1.67
2	1.00		0.05		+	黄绿	47	2
3	2.00		0.10		++	白绿	27	1.33
4	3.00		0.50		+++	黄	0	0
5	1.00			0.05	+++	黄	0	0
6	1.00		0.03	0.02	+++	黄	27	1.5
7	0.50	0.50	0.05		++	黄绿	52	2.15
8	1.00	1.00	0.05		++	白绿	12	1
9	0.50	0.50	0.10		++	黄绿	45	1.98
10	1.00	0.50	0.05		++	白绿	18	0.78

注: +++ 直径 > 2cm, ++ 1cm ≤ 直径 ≤ 2cm, + 直径 < 1cm (+++ diameter > 2cm, ++ 1cm ≤ diameter ≤ 2cm, + diameter < 1cm)

2.2 不同 N 源对增殖的影响

表2 不同 N 素组合对增殖的影响

处理号	N 源浓度(mg/L)		不定芽再 生率(%)	不定芽平 均高度(cm)	叶色	平均增 殖倍数
	NH ₄ NO ₃	KNO ₃				
11	10	10	47gE	0.6dD	黄绿	1.67eDE
12	20	20	100aA	2.115aA	绿	4.7875aA
13	30	30	64.5eD	1.10cC	黄绿	1.955dCD
14	10	20	81.5bB	1.15cC	黄绿	3.2025bB
15	20	30	74.5cC	0.55deDE	绿	2.2875cC
16	30	10	51.5fE	1.75bB	绿	1.795deD
17	10	30	70dC	0.415defDE	绿	2.025dCD
18	20	10	24hF	0.35efDE	绿	1.356fEF
19	30	20	17.5iG	0.28fE	绿	1.2575fF

注: a, b=0.05 A, B=0.01

与对照(11 #)相比较可以看出(表2), 不同程度增加了 N 素后, 各个处理(除 18 #、19 #)平均每苗再生芽数、不定芽再生率和平均增值倍数均有不同程度的提高。比较加入 N 源浓度值互为倒数的各对处理(14 #和 18 #、15 #和 19 #、16 #和 17 #)可以发现, NH₄NO₃/KNO₃ > 1 的处理中增值倍数均高于 NH₄NO₃/KNO₃ < 1 的处理。在 NH₄NO₃/KNO₃ = 1 的 3 个处理中, 12 #中不定芽再生率、不定芽的平均高度以及平均增值倍数都较其它处理显著。即在 NH₄NO₃ 浓度为 20mg/L、KNO₃ 浓度为 20mg/L 的 MS+1.00 mg/LBA+0.05 mg/LIBA 培养基中, 不定芽再生率最高达到 90%, 而平均增值倍数最高达到 4.7875。

2.3 不同生长素和 AgNO₃ 对生根的影响

通过试验看出(表3), 在附加 2 或 3 mg/LAgNO₃ 的各个培养基中, 生根率均达到 100%; 而附加 1.0 mg/LAgNO₃ 或未附加 AgNO₃ 的培养基中生根率低, 在 29 #培养基中生

根率为 20%。附加 NAA 的培养基中, 主根比 IBA、IAA 各处理中粗、短; NAA 浓度由 0.05 增加到 0.50 mg/L 主根长度随浓度的增加变短, 当 NAA 浓度为 0.50mg/L 时, 主根长为 0.68cm 并有轻度愈伤化出现。在附加 IAA 的培养基中, 主根长度居于 IBA、NAA 处理之间, 但主根细且须根较少。在附加 IBA 的培养基中, 根粗度居于 NAA 和 IAA 处理之间, 但长度最长; IBA 浓度由 0.05 增加到 0.50 mg/L, 主根数和须根增多, 当 IBA 浓度为 0.50mg/L 时, 生根数为 5 条, 主根长 5cm。在同一 IBA 浓度下添加不同浓度的 AgNO₃, 比较各处理可以看出, 当 AgNO₃ 为 2mg/L 根质量最好; 不加 AgNO₃ 或 AgNO₃ 为 1mg/L 时, 植株基部形成愈伤组织, 生根数为 2 或 3 条, 根细长且须根少; 当 AgNO₃ 浓度为 3 mg/L 时, 不形成愈伤组织, 但平均生根数为 2 且主根细长须根少。总的看来, 23 #即 1/2MS+0.05 mg/LNAA+2.0mg/LAgNO₃ 培养基中最有利于生根。

3 讨论

本研究用顶芽或腋芽为材料进行苦瓜离体快速繁殖试验, 在试验过程中发现愈伤组织容易形成, 与前人所得结论一致^[1-5], 各种处理愈伤组织诱导率均为 100%。在不定芽诱导过程中, 外界条件和外植体本身都是重要因素。有报道指出葫芦科植物由于在萌发阶段自身具有较高的内源激素 IAA^[6], 不需要外源激素或极低浓度的 2,4-D 均易诱导愈伤组织发生, 然而在分化培养基中分化率极低甚至不能分化^[7]。于为常^[7]的研究表明, S-24 和网纹香的各种外植体中内源 IAA 的含量很高, 超过一般植物的数倍, 并以胚轴中的含量最高, 而且愈伤组织中的 IAA 含量超过了各种外植体, 这可能是导致哈密瓜愈伤组织不易分化芽的原因。在苦瓜中也有类似的情况, 前人所做的试验得出, 苦瓜愈伤组织再分化不定芽难且诱导率低^[2-5]。顶芽及带芽茎段具有芽点, 可改变外界因子, 促进芽点直接萌发成苗。在其它愈伤组织不易分化的材料进行组织培养时, 可以通过这一途径达到快速繁殖的目的。

表3 生长素和 AgNO₃ 对生根的影响

处理号	处理因子浓度(mg/L)				平均生根数 (条)	生根率 %	平均主根长 (cm)	根形态
	IBA	NAA	IAA	AgNO ₃				
20	0.05			2.0	2	100	3.7	根细, 须根较少
21	0.10			2.0	3	100	4.9	根细长, 须根较少
22	0.50			2.0	5	100	5	根细长, 须根多
23		0.05		2.0	12	100	2.45	根粗、短, 须根多
24		0.10		2.0	4	100	2.22	根粗、较短, 须根多
25		0.50		2.0	8	100	0.68	根粗、极短, 轻度愈伤化
26			0.05	2.0	6	100	3.1	根细, 须根较多
27			0.10	2.0	3	100	2.88	根细, 须根少
28			0.50	2.0	3	100	2.4	根细, 几乎无须根
29	0.50			2	20	0.4		根生长在愈伤组织上, 短、无须根
30	0.50			1.0	3	60	3.0	根细长, 须根少
31	0.50			3.0	2	100	3.46	根细长, 须根少

激素调控试验可以得出, NAA 对不定芽诱导效果不如 IBA, 并且当 NAA 浓度由 0.02mg/L 增加到 0.05 mg/L 时, 增值倍数降低。生长素在较低浓度下可促进生长, 而高浓度时则抑制生长, 若加入过高浓度 NAA 会抑制不定芽的生长。而王小荣等^[8]的试验结果得出, 在 BA 1mg/L + NAA 0.5mg/L 或 NAA 1.0 mg/L 的 MS 培养基中, 获得芽的快速繁殖。这与本试验结果不一致, 可能是由于品种原因造成, 有待进一步研究。在 BA、KT、IBA 三个激素组合的培养基中, 不定芽分化效果最好, 说明苦瓜组织培养时, 不定芽诱导分化是由多激素综合效果调控。

瓜类蔬菜在栽培上是属于喜肥不耐瘠类型^[9], 因此在本试验中, 进行不同 N 素浓度试验。结果得出, 适当提高氮素浓度, 能促进不定芽发生, 提高增值倍数。在水培试验中得出, 番茄、四季豆、菠菜、茼蒿、甘蓝、洋葱等蔬菜为喜 NO₃⁻-N 蔬菜^[10]。蔬菜作物在以 NH₄⁺-N 为氮源时生长不良的原因, 一是由于不能忍受介质 pH 下降以及由此引起对 Ca²⁺ 吸收的下降; 二是由于蔬菜耐氨性差。在本试验中发现, 当 NH₄⁺-N/NO₃⁻-N > 1 时增值倍数低于 NH₄⁺-N/NO₃⁻-N < 1 时的增值倍数, 说明苦瓜也为喜 NO₃⁻-N 作物。但是, NH₄⁺-N、NO₃⁻-N 在浓度均为 20mg/L 时增值倍数最大, 可达到 4.8 说明在 NH₄⁺-N、NO₃⁻-N 浓度变化的同时, 苦瓜对其它元素的吸收受到影响(如 K), 从而影响增值倍数, 有待进一步研究。

在瓜类蔬菜中, AgNO₃ 在西瓜、黄瓜、甜瓜上应用较多。在黄瓜子叶组织培养中, 加入 2 mg/L AgNO₃ 愈伤组织诱导能力增强^[11], 促进芽的形成。在甜瓜上, 加入 5 ~ 8 mg/L AgNO₃ 可明显提高子叶外植体不定芽分化频率^[12]。在西瓜组织培养中, 加入 5 mg/L AgNO₃ 促进不定芽分化^[13]。在苦瓜中, AgNO₃ 在调控纯雌、雄株系性别分化上效果显著^[14]。在苦瓜组织培养中迄今没有报道。本试验中, 首次用 AgNO₃ 调控生根。1/2MS + 0.05mg/L NAA + 2.0mg/L AgNO₃ 培养基中可得到质量好的根系。Ag⁺ 的作用机理已取得一

些进展, Ag⁺ 作为乙烯抑制剂并非抑制乙烯的生成, 而是使得乙烯不能干扰多胺的合成, 多胺合成有利于促进再生芽的发生^[15], 但 AgNO₃ 能促进再生苗生根, 其机制目前尚不清楚。这有待于进一步研究。

参考文献:

- [1] Islam, R. Sarkar K. P., Naderuzzaman A. In vitro regeneration of plants from cotyledons of Momordia Charantia L. Plant-Tissue Culture (Bangladesh), 1994, 4(2): 105 ~ 109.
- [2] 苟小平、唐琳. 苦瓜叶肉原生质体的培养[J]. 四川大学学报(自然科学版), 1999, 6.
- [3] 申洪业. 苦瓜下胚轴离体培养研究诱导形成愈伤组织[J]. 吉林蔬菜, 1997, 1: 3-4.
- [4] Yang Man ye, Zhao Mao jun, Zeng Yu, Lan Li qong, Chen Fang. Establishment of In Vitro Regeneration System of Bitter.
- [5] 唐琳、苟小平. 用离体材料培养无性繁殖苦瓜[J]. 四川大学学报(自然科学版), 1999.
- [6] 熊长云, 张祖传. 一组丝瓜籽小分子核糖体失活蛋白的分离、纯化和性质. 生物化学与生物物理学报, 1998, 30(2): 142-146.
- [7] 于为常, 沈利爽, 文香玉, 等. 哈密瓜内源激素 IAA 的测定[J]. 中国科学院遗传所研究工作年报, 1990, 40-41.
- [8] 王小荣, 刘选明, 刘斌. 不同激素组合对苦瓜离体快速繁殖的调控[J]. 湖南师范大学自然科学学报, 2003, 26(4).
- [9] 李能芳, 刘永富. 无公害蔬菜栽培技术[M]. 四川科学技术出版社, 2004, 8: 169-174.
- [10] 马国瑞. 园艺植物营养与施肥[M]. 中国农业出版社, 1992: 92-93.
- [11] 史海水, 廖祥儒, 吴立峰, 等. 黄瓜组织培养与蛋白含量及抗氧化酶活性的变化[J]. 河北大学学报: 自然科学版, 2004, 24(6).
- [12] 钟俐, 钟伶. 新疆优质甜瓜高效离体再生体系的建立[J]. 新疆大学学报, 2002, 25(1).
- [13] 宋道军, 王浩波. 西瓜高效组织培养再生体系的初步研究[J]. 中国西瓜甜瓜, 2000(4), 8-11.
- [14] 杨蟹, 唐燕琼. AgNO₃, GA₃ 和温度对苦瓜纯雌、雄株系性别分化的影响[J]. 热带作物学报, 2004, 3.
- [15] Pua E C, Deng X, Koh A T C. Genotypic variability of de novo shoot morphogenesis of Brassica oleracea in vitro in response to ethylene inhibitors and putrescine. Plant Physiology, 1999, 155: 598-605.