

‘翠妃’苦瓜子叶不定芽诱导研究

李靖¹, 李焕秀², 李敏³

(1. 西昌学院 园艺系, 四川 西昌 625013; 2. 四川农业大学 林学院园艺学院 四川 雅安 625014; 3. 菏泽学院, 山东 菏泽 525013)

摘要:以‘翠妃’苦瓜子叶作为外植体,研究了子叶苗龄、子叶的部位、暗培养、硝酸银浓度等影响子叶不定芽诱导的主要因素。结果表明:以 9 d 左右的苗龄诱导不定芽效果最好,适合不定芽诱导培养基是 MS+BA 1.0 mg · L⁻¹+NAA 0.2 mg · L⁻¹;子叶不同部位不定芽的再生率差异显著,在子叶基端外植体临近下胚轴的部位诱导效果最好,不定芽诱导率为 54.21%;暗培养对子叶不定芽诱导有显著的促进效果,暗培养 7 d 可将不定芽再生率提高到 77.44%;AgNO₃ 对不定芽再生有明显的抑制作用,当浓度达到 6 mg · L⁻¹ 以上时,子叶块上就没有不定芽再生,只长有少量的根;不定芽在 MS+BA 0.5 mg · L⁻¹+NAA 0.1 mg · L⁻¹ 上增值效果较好,增值倍数为 5.40。

关键词: 苦瓜;子叶;不定芽;组织培养

中图分类号: S 642.503.6 文献标识码: A 文章编号: 1001—0009(2007)10—0181—03

苦瓜(*Momordica charantia* L.), 别名凉瓜, 古名锦荔枝、癞葡萄, 是葫芦科苦瓜属蔓性 1 a 生蔬菜。目前有关苦瓜的营养价值和药用价值研究已有不少报道, 但有关苦瓜组织培养方面的研究却报道得不多, 为了利用生物技术培育苦瓜优质新品种, 开展了苦瓜的组织培养技术研究。试验以子叶作为外植体, 探讨了不同苗龄的子叶、子叶块的部位、不同的植物生长调节剂、暗培养、硝酸银浓度等因素对不定芽再生的影响, 以期建立一个良好的高频再生受体系统, 从而为苦瓜的育种工作或基础研究打下基础。

1 材料与方法

试验所用的苦瓜种子来自于台湾农友种苗公司成都分公司。将种子剥去外壳, 用 75% 的酒精处理 30 s, 用 0.1% 升汞表面灭菌 20 min, 无菌水冲洗 3~5 次, 然后用滤纸吸干水分, 接种于 MS 基本培养基, 附加蔗糖 30 g · L⁻¹, 琼脂 8.5 g · L⁻¹ 的培养基中进行启动培养, 建立无菌的外植体系。试验过程中, 每个处理接种 20~25 个子叶块, 试验重复 3 次。如无特别说明, 培养条件为: 温度为白天 25℃, 夜晚 20℃, 光照强度 3 000 lx, 光周期 16 h/8 h, 相对湿度(RH)80%。

2 结果分析

2.1 不同生长调节剂对子叶不定芽诱导

分别从 5、7、9、11、13、15 日龄无菌苗上切取子叶小块, 并将子叶块剪为 0.5 cm² 的大小接种于表 1 所示的不同培养基上, 以子叶远轴面接触培养基接于诱导培养基上, 接种 30 d 后统计子叶不定芽的再生频率。培养 30 d 统计结果表明, 子叶在 6 号处理 (MS + BA 1.0 mg · L⁻¹ + NAA 0.2 mg · L⁻¹) 上诱导率最高, 达 54.21%。试验中发现, 在相同的生长素中分别加入 BA、KT, 在子叶的诱导过程中, BA 的效果明显好于 KT 的诱导效果。对于不同的生长素种类以及不同的浓度对不定芽的诱导也有很大影响, 其中 NAA 的效果好于 IAA, IAA 的效果好于 IBA, 在加入 2, 4-D 的处理中, 则没有不定芽产生。

表 1 生长调节剂对不定芽分化的影响

处理号	生长素浓度/mg · L ⁻¹	生长素种类	BA(KT)浓度/mg · L ⁻¹	加 BA 时不定芽再生率/%	加 KT 时不定芽再生率/%
1	1(0.1)	1(NAA)	1(0.5)	19.45	2.54
2	2(0.2)	2(IBA)	3(2.0)	21.08	3.43
3	3(0.3)	3(2,4-D)	4(3.0)	0	0
4	4(0.5)	4(IAA)	2(1.0)	23.81	3.62
5	1(0.1)	4(IAA)	1(0.5)	16.69	2.59
6	2(0.2)	1(NAA)	2(1.0)	54.21	15.57
7	3(0.3)	2(IBA)	3(2.0)	14.99	1.92
8	4(0.5)	3(2,4-D)	4(3.0)	0	0
9	1(0.1)	2(IBA)	4(3.0)	8.31	1.46
10	2(0.2)	3(2,4-D)	3(2.0)	0	0
11	3(0.3)	4(IAA)	2(1.0)	30.73	4.74
12	4(0.5)	1(NAA)	1(0.5)	9.75	1.88
13	1(0.1)	3(2,4-D)	2(1.0)	0	0
14	2(0.2)	4(IAA)	4(3.0)	8.86	1.67
15	3(0.3)	1(NAA)	1(0.5)	15.59	2.37
16	4(0.5)	2(IBA)	3(2.0)	6.76	1.44

注:表所列不定芽再生率为 9 日龄在不同处理上不定芽的再生情况(试验过程中观察到 5、7、11、13、15 日龄子叶块在这些处理上不定芽的诱导总体趋势相同,但诱导效果不如 9 日龄好。

第一作者简介: 李靖(1978-), 女, 硕士, 讲师, 从事园艺植物生物技术工作。

通讯作者: 李焕秀。

基金项目: 四川省科技厅“生物技术专项”资助项目(01LD12)。

收稿日期: 2007—05—21

2.2 不同苗龄对不定芽分化的影响

表2为5、7、9、11、13、15日龄无菌子叶小块在MS+BA 1.0 mg · L⁻¹ + NAA 0.2 mg · L⁻¹诱导培养基中的生长情况调查结果。在试验中发现, 5~7 d苗龄的子叶幼嫩、黄色, 细胞生长迅速, 再分化能力弱, 诱导率不高; 9日龄左右的子叶绿色、旺盛, 再分化能力强, 诱导率高, 为54.21%, 而且平均每块子叶再生芽数也最多, 为2.83个; 11~15日龄的子叶已开始由绿色变成深绿色, 并开始出现衰老现象, 因此这时子叶块不定芽分化率较低, 仅为11.0%。

表 2 苗龄对不定芽分化的影响		
苗龄 d	不定芽再生率/ %	平均每块再生芽数
5	22.0dD	1.33cB
7	30.67cC	1.57bcAB
9	54.21Aa	2.83aA
11	44.68Bb	1.85abAB
13	35.68Cc	1.34cB
15	11.0eE	1.21cB

注: 大小写字母表示显著性水平(a=0.05, A=0.01), 以下同。

2.3 子叶不同部位对不定芽分化的影响

取9日龄的子叶, 先横切为三, 将其分为子叶的基端、中部和远端三部分, 再将各部分切成0.5 cm²小块, 分别接种到MS+BA 1.0 mg · L⁻¹ + NAA0.2 mg · L⁻¹诱导培养基上, 30 d统计结果(见表3)。接种后5 d, 观察到子叶不同部位的切块开始膨大, 并有少量的愈伤组织产生, 15 d时各部位的切口边缘均能高频地诱导出愈伤组织。30 d统计结果表明, 子叶不同部位中, 以子叶基部的不定芽诱导率最高, 为87.33%; 中部有一定的芽诱导率, 但不高, 为15.34%; 而顶端部位则没有不定芽再生, 只长愈伤组织, 且这个部位的愈伤组织很难诱导出芽。在试验中还观察到, 子叶不定芽再生有二种途径, 一种是直接在切口边缘长出不定芽; 另一种是从愈伤组织上长出不定芽, 这时又分两种情形, 一种是直接从愈伤组织上长出正常的芽, 另一种是先从愈伤组织上长出一个不定叶, 再从不定叶的叶柄基部长出芽。

表 3 子叶不同部位对不定芽分化的影响		
外植体的部位	不定芽再生率/ %	平均每块再生芽数
基端	87.33aA	2.74aA
中部	15.34bB	1.17bB
顶端	0cC	0cC

2.4 暗培养对子叶不定芽分化的影响

取9日龄的子叶块接种于培养基MS+BA 1.0 mg · L⁻¹ + NAA 0.2 mg · L⁻¹上, 对其分别进行0、7、14、21 d的暗培养, 然后再转入光下常规培养。30 d对不定芽的统计结果见表4。试验中观察发现, 经暗培养一段时间后, 子叶愈伤组织的生长量较一直经常规培养的生长量大, 其中暗培养7 d时不定芽的诱导效果最佳(不定芽再生率比未经暗培养时提高了25.45%)。随着暗培

养时间的增加, 不定芽再生率呈下降趋势, 但其诱导率都高于未经暗培养的诱导率。此外, 经暗培养后, 平均每块子叶再生芽数也有明显的增加, 只有经21 d暗培养后其子叶块再生芽数低于未经暗培养时的芽数。

表 4 暗培养对苦瓜子叶不定芽再生的影响

暗培养 d	不定芽再生率/ %	平均每块再生芽数
0	52.98dD	2.15dC
7	77.44aA	3.23aA
14	62.35bB	2.21cBC
21	55.14cC	2.27bB

2.5 硝酸银对子叶不定芽分化的影响

将9日龄的子叶块接种于培养基MS+BA 1.0 mg · L⁻¹ + NAA 0.2 mg · L⁻¹并附加不同浓度(见表5)的AgNO₃, 接种后常规培养。试验中观察到, 加了AgNO₃后子叶不定芽的再生率明显受到抑制, 当AgNO₃浓度达到6.0 mg · L⁻¹及以上, 子叶就只长少量的根而没有不定芽长出, 而且随着培养时间的延长, 外植体逐渐变黄死去。

表 5 硝酸银浓度对子叶不定芽再生的影响

AgNO ₃ /mg · L ⁻¹	不定芽再生率/ %	平均每块再生芽数
0	55.09aA	2.32aA
2	35.37bB	1.72bB
4	22.64cC	1.21cC
6	0dD	0dD
8	0dD	0dD

2.6 不定芽继代增殖培养

子叶上再生出的不定芽在诱导培养基中不易伸长, 将其转入增殖培养基中, 芽苗伸长速度加快, 节间距加长, 叶面积增大, 并有腋芽萌动, 形成新的分枝。在试验所列(表6)的激素组合下, 芽接种后5 d左右开始在基部长出愈伤组织, 8 d左右开始陆续增殖, 一般可以达到3~7个无根苗。培养30 d统计结果如表6所示。从表中可以看出, 1号培养基是较适合的增殖培养基, 增殖倍数为5.4倍。

表 6 子叶不定芽继代增殖培养

处理号	BA/ mg · L ⁻¹	NAA/ mg · L ⁻¹	平均增殖倍数
1	0.5	0.1	5.40
2	0.5	0.3	4.97
3	0.5	0.5	4.10
4	0.75	0.1	5.27
5	0.75	0.3	4.42
6	0.75	0.5	3.69
7	1.0	0.1	4.61
8	1.0	0.3	3.36
9	1.0	0.5	2.98

3 讨论

通过试验可以看出, 生长调节剂对于植物组织离体培养起着十分重要的作用。植物离体培养成功与否, 除了要选择正确的基本培养基和适合于组培苗生长的光照时间和光照强度, 培养温度及湿度以外, 激素种类和

浓度配比也是其重要影响因素之一。

子叶苗龄对不定芽的诱导也有很大影响。试验中发现, 5 ~ 7 d 苗龄的子叶幼嫩、黄色, 细胞生长迅速, 再分化能力弱; 9 日龄左右的子叶绿色、旺盛, 再分化能力强; 11 ~ 15 日龄的子叶已开始由绿色变成深绿色, 并开始出现衰老现象。与任春梅等^[1]、王果萍^[2]的研究结果一致。因此, 子叶外植体的生理年龄是离体培养能否成功的重要因素, 选择适龄的子叶是提高不定芽诱导率的关键之一。

子叶块的不同部位再分化能力也不相同, 试验中发现, 以子叶基部作外植体的诱导效果最好, 中部有一定的芽诱导率, 但不高, 而顶端部位则没有不定芽再生, 这与王春霞^[3]、赵建萍^[4]的研究结果一致。即离胚轴近的地方不定芽再生率高。这可能是离胚轴近的部位比远的部位细胞分化能力强。

试验中发现, 暗培养对子叶不定芽的再生有明显的促进作用, 与王春霞^[3]、尹俊等^[5]的研究结果一致。关于暗培养对叶片再生的促进作用, 张志宏^[6]认为可能只是源于对植物种激素水平的影响上, 暗培养延缓了 IAA 的失活, 使组织中未结合态 IAA 含量保持一定浓度, 愈伤组织增多, 组织中可能有较多细胞 IAA 含量达到使其能够再生的浓度。该暗培养试验中, 发生不定芽的培养基组合中并未添加 IAA, 因此暗培养促进不定芽再生的机理有待于进一步研究。

试验中发现, 加了 AgNO₃ 后子叶不定芽的再生率明显受到抑制, 这与赵军良等^[7]、孙月芳等^[8]的研究结果一致。可能是 Ag⁺ 破坏了离子平衡, 也可能是对外植体产生了毒害作用所致。

在继代培养中, 芽的增殖速度是离体培养快繁中最为重要的一个问题, 增殖速度快在生产实践中才有应用价值, 决定增殖速度的最主要因子是材料本身的生理生化状态, 外植体的生理生化状态可通过适当的生长调节剂去调节, 也可以通过继代培养得到改善。

参考文献

[1] 任春梅 董延瑜, 洪亚辉, 等. 西瓜组织培养的研究[J]. 湖南农业大学学报 2000 26(2): 50-53.
[2] 王果萍. 西瓜高效组织培养技术体系研究[J]. 中国西瓜甜瓜, 2002 (2): 1-3.
[3] 王春霞 简志英 刘愚, 等. ‘京欣 1 号’西瓜子叶组织培养的研究[J]. 园艺学报, 1996(23): 401-403.
[4] 赵建萍. ‘艾西丝’南瓜子叶的离体培养[J]. 园艺学报 1999, 26(3): 196-197.
[5] 尹俊, 徐妙云, 贾小平, 等. 河套密瓜体胚发生及植株再生的研究[J]. 园艺学报, 2000(27): 455-457.
[6] 张志宏. 苹果叶片离体再生不定芽及遗传转化研究[D]. 沈阳: 沈阳农业大学博士论文, 1996.
[7] 赵军良 马蓉丽, 李昌华. 黄瓜子叶组织培养再生植株[J]. 山东农业科学 1996 24(1): 39-41.
[8] 孙月芳, 陆瑞菊, 黄剑华. 杂种甜椒的离体快速繁殖[J]. 植物生理学通讯 2001, 37(3): 215-216.

The System of In Vitro Culture and Shoot Regeneration from Cotyledon of Balsam Pear of Cuifei'

LI Jing¹, LI Huan Xiu², LI Min³

(1. Horticulture Department, Xichang Agricultural College, Xichang 625013 China; 2. College of Forestry and Horticulture, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014 China; 3. Heze College, Heze, Shandong 525013, China)

Abstract: In this study, the age and site of cotyledon, dark period, AgNO₃ concentrations in vitro were analyzed and the system of in vitro culture and shoot regeneration from cotyledons of Cuifei' Balsam Pear (*Momordica charantia* L.) was established. The results were as follows: Different age and site of cotyledon has different effect on shoot regeneration. In this experiment, the age of 9 day was the best period for shoot regeneration, the site near to hypocotyl was the best site for shoot regeneration. One week of dark treatment increased the rate of shoot regeneration from 51.98% to 77.44%. However, with the extension of dark periods, the shoot regeneration rate decreased. On the best combination of plant growth regulators for shoot regeneration, the addition of AgNO₃ varied from 0 mg · L⁻¹ to 8 mg · L⁻¹ in the medium could not help to stimulated shoot regeneration, but growing a few roots. The best of propagation rate on MS supplemented with 0.5 mg · L⁻¹ BA and 0.1 mg · L⁻¹ NAA could reach 5.40.

Key words: Balsam Pear (*Momordica charantia* L.); Cotyledon; Shoot Regeneration; Tissue Culture