

# 苦瓜花药培养诱导愈伤组织的研究

何 艳, 李焕秀, 郑阳霞, 严泽生

(四川农业大学 林学院园艺学院 四川 雅安 625014)

**摘 要:**以 3 个苦瓜品种为材料进行花药愈伤组织诱导的研究。结果表明:在附加 2, 4-D 2.0 mg/L 和 6-BA 2.0 mg/L 的 MS 培养基上, 各品种出愈率最高, 碧秀 65.91%、大白 82.14%、长白 94.74%; 单核中、晚期的花药愈伤诱导率显著高于其它时期; 新鲜花药的出愈率高于经过 4℃ 预处理后的花药。

**关键词:** 苦瓜; 花药培养; 愈伤组织

**中图分类号:** S 642.503.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2008)12-0164-03

苦瓜 (*Momordica charantia* L.) 为葫芦科苦瓜属 1a 生蔓性草本植物, 是南方主要的瓜类蔬菜之一。目前有关苦瓜的离体培养方面的报道较少, 主要是进行苦瓜茎段离体快繁和子叶诱导研究<sup>[1-4]</sup>, 且效果都不理想, 尚未涉及苦瓜花药培养。花药培养是获得单倍体植株的有效途径之一, 可以缩短育种周期, 提高选择效率, 加快新品种选择的进程。该试验以 3 个四川主栽苦瓜品种的花药为外植体材料, 从基因型、激素配比、花药不同发育时期、预处理时间等方面对苦瓜花药愈伤组织诱导的影响进行了研究, 以期寻找苦瓜花药愈伤组织诱导的最佳条件, 为苦瓜的倍性育种提供育种材料。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

供试材料为碧秀苦瓜、长白苦瓜、大白苦瓜。

### 1.2 小孢子发育时期和花蕾外观形态相关性的确定

取苦瓜植株上大小不同的雄花花蕾, 取蕾时间上午 8~10 时。将花蕾投入卡诺固定液中固定 12 h, 卡宝品红染色, 镜检。当某一发育时期的小孢子数超过观察数的 50% 时, 认为该花药内的小孢子处于该发育时期。观察花蕾外部形态特征, 建立花蕾外观形态与花药小孢子发育时期的对应关系。

### 1.3 花药消毒和接种

将采集来的花蕾先无菌工作台上用 75% 酒精处理 30 s, 再放入 0.1% 升汞消毒 7~8 min, 无菌水冲洗 4~5 次。然后用滤纸吸干水分, 剥出花药, 接种到愈伤组织诱导培养基上。每瓶接种 10~15 个花药, 每个处理接种 5 瓶, 重复 3 次。花蕾均先在 4℃ 条件下预处理 1 d, 培养基中添加蔗糖 50 g/L, 琼脂 8 g/L, pH 5.8。先 30℃

暗培养 10 d, 然后转入白天 28℃, 光照 1 500 lx, 夜间 22℃ 条件下继续培养。

### 1.4 不同激素对比对花药愈伤组织诱导的影响

以 MS 为基本培养基, 不同激素种类和浓度采用两因素 (6-BA、2, 4-D) 多水平 (6-BA 1.0、2.0、3.0 mg/L 和 2, 4-D 0.01、0.05、0.1、0.5、1.0、2.0 mg/L) 完全组合设计, 共 18 个处理。观察其对苦瓜花药诱导的影响。30 d 后统计愈伤组织的诱导情况。

### 1.5 不同发育时期对花药愈伤组织诱导的影响

将处于四分体时期、单核早期和单核中晚期的花药分别接种在筛选出的最佳诱导培养基上进行培养。

### 1.6 低温预处理时间对花药愈伤组织诱导的影响

摘取小孢子处于单核中晚期的花蕾, 将花蕾置于 4℃ 分别进行 0、1、2、3、4 d 预处理, 然后接种到筛选出的最佳诱导培养基中进行培养。

## 2 结果与分析

### 2.1 小孢子发育时期和花蕾外部形态相关性的确定

通过镜检观察, 各品种的花蕾大小与花药发育时期符合以下相关性: 当花蕾长度为 2.5~3.5 mm 时花药处于四分体时期, 花蕾长度为 3.5~4.5 mm 时为单核早期, 花蕾长度为 4.5~6.0 mm 时为单核中晚期, 花蕾长度 > 6 mm 时开始进入双核期。

### 2.2 不同激素对比对苦瓜花药愈伤组织诱导的影响

试验结果 (表 1) 表明, 不同激素浓度对苦瓜花药愈伤组织诱导的影响不同。当 2, 4-D 浓度为 2.0 mg/L、6-BA 浓度 2.0 mg/L 时, 各品种的花药愈伤组织诱导率最高, 长白苦瓜达到了 94.74%, 大白为 82.14%, 碧秀为 65.91%。碧秀苦瓜和大白苦瓜 6-BA 浓度为 2.0 mg/L 时较利于花药愈伤的诱导, 高于或低于 2.0 mg/L 时的愈伤组织诱导率均有所下降, 而长白苦瓜在 6-BA 3.0 mg/L、2, 4-D 1.0 mg/L 和 2.0 mg/L 时愈伤组织诱导率仍保持较高。2, 4-D 浓度的变化对花药愈伤组织的诱导

第一作者简介: 何艳 (1983-), 女, 硕士, 现从事生物技术在蔬菜生产中的应用研究工作。E-mail: hy420@163.com。

收稿日期: 2008-07-16

影响明显,低浓度2,4-D处理中各品种出愈率均较低,随着其浓度增加时,各品种花药愈伤组织诱导率普遍随之

增加。诱导出的愈伤组织大部分在15 d左右开始转绿,30 d后完全转绿,少部分愈伤保持黄白色不转绿。

表 1 不同激素比对花药愈伤组织诱导的影响

| 2,4-D               |  | 6-BA                |  | 愈伤组织的诱导率/% |         |        | 2,4-D               |  | 6-BA                |  | 愈伤组织的诱导率/% |         |        |
|---------------------|--|---------------------|--|------------|---------|--------|---------------------|--|---------------------|--|------------|---------|--------|
| /mg·L <sup>-1</sup> |  | /mg·L <sup>-1</sup> |  | 锦秀         | 大白      | 长白     | /mg·L <sup>-1</sup> |  | /mg·L <sup>-1</sup> |  | 碧秀         | 大白      | 长白     |
| 0.01                |  | 1.0                 |  | 21.74ef    | 13.50i  | 4.65fg | 0.5                 |  | 2.0                 |  | 65.38a     | 73.07b  | 62.50b |
| 0.05                |  | 1.0                 |  | 12.12g     | 23.25h  | 34.88d | 1.0                 |  | 2.0                 |  | 56.79a     | 72.20b  | 63.64b |
| 0.1                 |  | 1.0                 |  | 29.41d     | 29.39g  | 13.43e | 2.0                 |  | 2.0                 |  | 65.91a     | 82.14a  | 94.7a  |
| 0.5                 |  | 1.0                 |  | 45.28b     | 39.27de | 44.91c | 0.01                |  | 3.0                 |  | 14.00fg    | 11.11i  | —      |
| 1.0                 |  | 1.0                 |  | 60.38a     | 55.38c  | 69.93b | 0.05                |  | 3.0                 |  | 12.50g     | 11.53i  | —      |
| 2.0                 |  | 1.0                 |  | 23.33de    | 67.74b  | 29.73d | 0.1                 |  | 3.0                 |  | —          | 18.75h  | —      |
| 0.01                |  | 2.0                 |  | 18.87ef    | 36.53ef | 6.25f  | 0.5                 |  | 3.0                 |  | 3.85i      | 23.04h  | 18.03e |
| 0.05                |  | 2.0                 |  | 8.00h      | 44.64d  | 1.89g  | 1.0                 |  | 3.0                 |  | 14.55fg    | 21.42h  | 88.37a |
| 0.1                 |  | 2.0                 |  | 12.96g     | 52.63c  | 3.64fg | 2.0                 |  | 3.0                 |  | 34.55c     | 32.00fg | 87.5a  |

注:数据用邓肯氏新复极差法进行检验(a b=0.05),以下同。

2.3 不同发育时期对苦瓜花药愈伤组织诱导的影响

将不同发育期的苦瓜花药接种到最佳诱导培养基上。研究结果表明(表2),每个品种都以单核中、晚期的花药愈伤诱导率最高,显著的高于四分体时期和单核晚期。单核中晚期时,碧秀、大白、长白的愈伤组织诱导率分别为79.74%、74.79%、89.38%。

表 2 小孢子发育时期对苦瓜花药愈伤组织诱导的影响

| 小孢子发育时期 | 愈伤组织的诱导率/% |        |        |
|---------|------------|--------|--------|
|         | 碧秀         | 大白     | 长白     |
| 四分体时期   | 15.38c     | 18.59c | 9.64c  |
| 单核早期    | 53.94b     | 66.84b | 58.46b |
| 单核中晚期   | 79.74a     | 74.79a | 89.38a |

2.4 低温预处理时间对苦瓜花药愈伤组织诱导的影响

供试的3个苦瓜品种花药的愈伤组织诱导率均随

着低温预处理时间的延长而逐渐下降,均以未经过预处理的花药愈伤组织诱导率最高(表3)。预处理天数达4 d时,愈伤组织诱导率大幅下降,碧秀由53.19%降到18.18%,大白苦瓜由74.82%降到24.38%,长白从88.40%降到26.83%。

表 3 低温预处理对苦瓜花药愈伤组织诱导的影响

| 预处理时间/d | 愈伤组织的诱导率/% |        |        |
|---------|------------|--------|--------|
|         | 碧秀         | 大白     | 长白     |
| 0       | 53.19a     | 74.82a | 88.40a |
| 1       | 48.27ab    | 73.57a | 75.51b |
| 2       | 42.10b     | 67.93a | 68.18c |
| 3       | 17.74c     | 50.24b | 52.38d |
| 4       | 18.18c     | 24.38c | 26.83e |

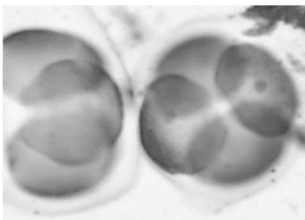


图 1 小孢子四分体时期

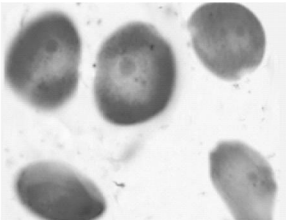


图 2 单核小孢子

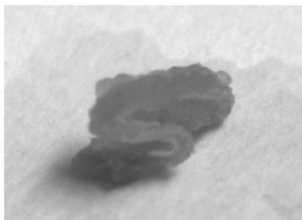


图 3 膨大并开始长愈伤的花药



图 4 花药产生的愈伤组织



图 5 未转绿的瘤状愈伤组织

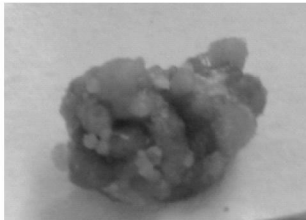


图 6 完全转绿的愈伤组织

3 讨论

在花药离体培养过程中,各激素的配比及浓度对愈伤组织的诱导具有重要的影响。它们的组成与浓度不但影响着出愈率,而且对愈伤组织的质量也有重要的调

控作用,特别是2,4-D是启动小孢子细胞分裂形成愈伤组织的必要条件<sup>[5]</sup>。该试验中2,4-D与6-BA相比,起着主导作用,表明2,4-D在苦瓜花药愈伤组织诱导中起着关键作用。

在以往苦瓜的离体培养试验中<sup>[24]</sup> 普遍表现为易于产生愈伤组织而难以再生不定芽。该试验中也出现类似的问题, 在添加高浓度 6-BA 的处理中也未出现芽的分化。宋莉英等对苦瓜子叶、上胚轴、下胚轴离体培养过程中不同发育阶段的内源激素含量的变化进行了测定, 结果表明苦瓜外植体中 IAA 含量较高, 而 iPA 含量过低是苦瓜易于产生愈伤组织而难以再生不定芽的主要原因<sup>[9]</sup>。而苦瓜花药培养中难以再生不定芽是否由 IAA 含量高所致, 尚需进一步研究。在 2, 4-D 2.0 mg/L 和 6-BA 1.0 mg/L 处理中长白苦瓜花药分化出了根, 其根的分化率为 16.36%。苦瓜花药不定芽的诱导还有待深入研究。

花药内小孢子发育时期直接影响愈伤组织的形成, 花药发育时期选择是否恰当是花药培养成败的关键。大多数瓜类花药培养试验中, 都是单核中晚期的花药最易形成花药胚或花药愈伤组织<sup>[7-9]</sup>。该试验结果表明 3 个苦瓜品种的花药培养也在单核中晚期时愈伤组织诱导率最高, 显著的高于四分体时期和单核早期。

对于某些物种, 培养前对花药进行适当的低温预处理能显著提高培养效果, 对启动小孢子核分裂和愈伤组织形成起促进作用<sup>[8-11]</sup>。预处理的目的是从形态上改变其极性分布, 从生理生化上改变其细胞生理状态, 以改变其分裂方式和发育途径。而该试验中, 低温预处理出现负效应, 未经过低温预处理的新鲜花药的愈伤组织诱导率高于经过低温预处理的花药。陈红等进行枇杷

花药愈伤组织诱导时也得到类似的结果<sup>[12]</sup>。推测造成这种差异的原因可能与物种的不同有关。可见低温预处理并不能有效的提高苦瓜花药愈伤组织诱导率, 促进雄核发育, 其机理有待于进一步进行研究。

### 参考文献

- [1] 卢其能 罗惟希. 苦瓜的组织培养[J]. 江西农业科技, 1993(2): 40.
- [2] 申洪业. 苦瓜下胚轴离体培养诱导形成愈伤组织[J]. 吉林蔬菜, 1997(1): 3-4.
- [3] 唐琳, 陈放, 贾勇炯. 苦瓜的离体繁殖[J]. 植物生理学通讯, 1997, 33: 26-27.
- [4] 唐琳, 苟小平, 陈放, 等. 用离体培养无性繁殖苦瓜[J]. 四川大学学报(自然科学版), 1999, 36: 144-147.
- [5] 李守岭, 庄南生. 植物花药培养及其影响因素研究进展[J]. 亚热带植物科学, 2006, 35(3): 76-80.
- [6] 宋莉英, 高峰. 苦瓜离体培养过程中内源激素含量的变化[J]. 植物学通报, 2006(12): 192-196.
- [7] 苏华, 京宝燕, 任华中. 黄瓜花药培养中若干影响因素的研究[J]. 沈阳农业大学学报, 2006, 37(3): 470-472.
- [8] 马刘枫, 辛建华. 甜瓜花药愈伤组织分化与激素处理间的关系[J]. 中国瓜菜, 2006(2): 4.
- [9] 陈佳, 李焕秀. 瓜类蔬菜作物花药组织培养研究进展[J]. 长江蔬菜, 2007(3): 39-41.
- [10] 缙艳露, 张明方. 葫芦科花药培养再生体系与单倍体育种[J]. 北方园艺, 2006(4): 63-66.
- [11] Ashok Kumar H G, Murthy H N. Effect of sugars and amion acids on androgenesis of Cucumis sativus[J]. Plant Cell, Issue and Organ Culture, 2004, 78: 201-208.
- [12] 陈红, 王永清. 枇杷花药培养诱导愈伤组织的研究[J]. 安徽农业科学, 2007, 35(27): 8453-8454.

## Study on the Callus Induction in Anther Culture of Balsam Pear(*Momordica Charantia* L.)

HE Yan, LI Huan-xiu, ZHENG Yang-xia, YAN Ze-sheng

(Forestry and Horticulture College of Sichuan Agricultural University, Ya'an, Sichuan 625014, China)

**Abstract:** The callus induction in anther culture of three kind of balsam pear (*Momordica charantia* L.) was studied. The results showed that each variety had the highest inductivity of callus in MS medium with 2, 4-D 2.0 mg/L and 6-BA 2.0 mg/L, as the Bixin's 65.91%, Dabai's 82.14% and Changbai's 94.74%. The callus formation rate of late-uninucleate was notable higher than other microspore developmental stages, and the fresh anthers formed more calluses than the anthers had been pretreatment under 4℃.

**Key words:** *Momordica charantia*; Anther culture; Callus