

苦瓜子叶离体再生体系的建立

郑阳霞, 李焕秀, 严泽生, 秦耀国, 贺忠群

(四川农业大学 园艺学院, 四川 雅安 625014)

摘 要:以“圣香”苦瓜、“玉华”苦瓜的子叶为外植体进行离体培养植株再生研究。结果表明: 2个苦瓜品种的子叶在不同的培养基上都较易形成愈伤组织, 愈伤组织诱导率都达到80%以上。培养基MS+TDZ 0.05 mg/L+NAA 0.02 mg/L 适合“圣香”苦瓜子叶不定芽分化, 分化率为68.4%; 培养基MS+TDZ 0.03 mg/L+NAA 0.02 mg/L 适合“玉华”苦瓜子叶不定芽分化, 分化率为67.8%。“圣香”苦瓜在培养基上MS+ZT 0.3 mg/L+NAA 0.01 mg/L上丛生芽诱导效果好, 增殖率达6.5; “玉华”苦瓜丛生芽诱导的最佳培养基为MS+TDZ 0.02 mg/L+NAA 0.01 mg/L, 增殖率达6.6。生根诱导以1/2MS+NAA 0.05 mg/L培养基诱导率最高, “圣香”苦瓜生根率为90.7%, “玉华”苦瓜生根率达91.9%。

关键词:苦瓜; 子叶; 植株再生

中图分类号:S 642.5 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2011)15-0163-03

苦瓜(*Momordica charantia* L.)属于葫芦科(Cucurbitaceae)苦瓜属, 是一种药食兼用的重要蔬菜。20世纪90年代, 人们对苦瓜组织培养进行了研究, 但是至今苦瓜离体培养植株再生仍十分困难。苦瓜的再生途径主要是通过器官发生, 外植体的类型主要有茎尖^[1-2]、茎段^[1-3]、下胚轴^[4-6]、子叶^[7-11]、真叶^[6, 10, 12]等。研究发现苦瓜离体培养较易产生愈伤组织而难以再生不定芽, 不定芽再生率低^[2-6]。此外, 不同的研究者所得的结论差异较大, 可重复性差。这一情况严重的制约了生物技术在苦瓜上的应用。现以“圣香”苦瓜、“玉华”苦瓜为材料, 旨在通过子叶直接诱导不定芽或诱导愈伤组织产生不定芽, 探索最佳培养程序, 进一步完善苦瓜再生技术, 提高植株再生频率, 为苦瓜的遗传转化和突变体筛选提供材料和技术基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试苦瓜品种“圣香”、“玉华”, 购自四川省农业科学院。

1.2 试验方法

1.2.1 无菌苗的获得 将带壳苦瓜子用75%的酒精处理20 s, 无菌水冲洗3次。在无菌的条件下去壳, 去壳后再用75%的酒精处理10 s, 无菌水冲洗3次。转入0.1%升汞浸泡10 min, 无菌水冲洗数次, 接种于

MS培养基上。

1.2.2 外植体的接种 苦瓜子叶呈浅绿色, 略微分开时, 切去每片子叶的基部和顶部, 再横切为二, 正面朝上, 背面朝下接种到不定芽分化培养基上。暗培养7 d后, 转入光照培养。

1.2.3 培养基的种类 分化培养基以MS为基本培养基, 添加不同浓度的6-BA、ZT、TDZ、NAA(表1)。每个处理接种40个外植体, 3周继代1次。培养60 d后统计外植体愈伤组织的诱导率 and 不定芽的分化率。然后将获得的不定芽接种于增殖培养基上, 增殖培养基以MS为基本培养基, 添加不同浓度的6-BA、ZT、TDZ、NAA(表2)。每个处理接种30个外植体。3周继代1次, 40 d后统计增殖倍数。将增殖后的不定芽(芽高>2 cm)切割转入生根培养基中, 生根培养基以1/2MS为基本培养基, 添加不同浓度的NAA(表3)。每个处理接种30个不定芽, 30 d后统计生根情况。以上培养基中均加入0.6%琼脂, 3%蔗糖。灭菌前调pH 5.8~6.0。培养温度为(25±2)℃, 光照强度为2 000 lx, 每天光照12 h。

2 结果与分析

2.1 不定芽的分化

将子叶接种于不定芽分化培养基中, 5 d后叶片开始肿胀隆起, 切口处开始形成愈伤组织, 14 d后产生明显可见的愈伤组织。从表1可看出, 苦瓜愈伤组织的诱导和不定芽的分化受生长调节剂种类和浓度的影响。“圣香”苦瓜、“玉华”苦瓜在不同的培养基上均易形成愈伤组织, 愈伤组织诱导率都达到80%以上。但愈伤组织的颜色不同, 有绿色、黄绿、黄色3种颜色。A1、A4、A5培养基中形成的愈伤组织为绿色, 质地致密; A2、A3、A6、A7培养基中形成的愈伤组织为黄绿

第一作者简介: 郑阳霞(1977-), 女, 博士, 副教授, 研究方向为园艺植物生物技术。E-mail: zhengyangxia@163.com。

基金项目: 四川农业大学青年科技创新基金资助项目(00330900)。

收稿日期: 2011-05-05

色,质地疏松,易切割,切分后中间为绿色,其余培养基为黄色愈伤组织。说明生长调节剂的种类和浓度影响愈伤组织的类型。经过 2 次继代培养后,3 种类型的愈伤组织均逐渐分化出不定芽,但绿色愈伤不定芽分化率较低。“圣香”苦瓜在 A13 培养基上不定芽诱导率

最高为 68.4%,“玉华”苦瓜在 A12 培养基上不定芽诱导率最高为 67.8%,显著的高于其它处理组合。总的来看,不定芽的分化 ZT(玉米素)、TDZ(噻重氮苯基脲)的效果明显好于 6-BA(苄氨基腺嘌呤)。

表 1 生长调节剂对苦瓜子叶愈伤组织诱导和不芽分化的影响

Table 1 Effects of growth regulator on callus induction of balsam pear cotyledon and buds differentiation

培养基 Medium					“圣香”苦瓜“Shengxiang”		“玉华”苦瓜“Yuhua”	
代号	6-BA	ZT	TDZ	NAA	愈伤诱导率	不定芽分化率	愈伤诱导率	不定芽分化率
Code	/mg · L ⁻¹	/mg · L ⁻¹	/mg · L ⁻¹	/mg · L ⁻¹	Rate of callus /%	Rate of adventitious bud/%	Rate of callus /%	Rate of adventitious bud/%
A1	0.1			0.02	80.9g	42.2 i	80.6e	39.6j
A2	0.3			0.02	83.8ef	45.2 h	83.9cd	41.9hi
A3	0.5			0.02	90.2bc	47.3 g	88.9a	44.9fg
A4	1.0			0.02	85.2e	41.1 i	84.4cd	40.4ij
A5	2.0			0.02	81.3g	39.0 j	80.1e	34.9 k
A6		0.2		0.02	81.9fg	45.9 gh	80.4e	43.4gh
A7		0.5		0.02	89.1cd	49.4 f	88.4a	45.2f
A8		1.0		0.02	92.2a	62.4 c	89.1a	63.6b
A9		1.5		0.02	88.2d	59.4 d	85.6bc	59.0c
A10		2.0		0.02	84.1ef	44.6 h	82.8d	48.4e
A11			0.01	0.02	81.9fg	50.3 f	80.5e	49.0e
A12			0.03	0.02	85.2e	56.5 e	86.4b	67.8a
A13			0.05	0.02	88.4cd	68.4 a	89.3a	54.6d
A14			0.1	0.02	91.5ab	64.2 b	88.4a	59.7c
A15			0.5	0.02	85.0e	56.2 e	82.9d	54.4d

注:表中同列数字后不同的字母表示差异显著(P=0.05)。下表同。
Note: Different letters indicated significant difference at the 5% level. The same as in the following tables.

2.2 不定芽的增殖

将不定芽转入增殖培养基中,接种后 7 d 开始在基部产生愈伤组织,10 d 后开始增殖。从表 2 可看出,6-BA、ZT、TDZ 对苦瓜从生苗的诱导都有一定的促进

作用。“圣香”苦瓜在 B6 培养基上丛生芽诱导效果最好,增殖倍数为 6.5。“玉华”苦瓜在 B10 培养基上丛生芽诱导效果最好,增殖倍数为 6.6,显著的高于其它处理,而且丛生芽生长健壮。

表 2 生长调节剂对不定芽增殖的影响

Table 2 Effect of growth regulator on adventitious bud multiplication

培养基 Medium					“圣香”苦瓜“Shengxiang”		“玉华”苦瓜“Yuhua”	
代号	6-BA	ZT	TDZ	NAA	增殖倍数	芽苗高度	增殖倍数	芽苗高度
Code	/mg · L ⁻¹	/mg · L ⁻¹	/mg · L ⁻¹	/mg · L ⁻¹	Rate of multiplication	Height of shoots/cm	Rate of multiplication	Height of shoots/cm
B1	0.1			0.01	2.3f	1.3d	2.5h	1.0f
B2	0.2			0.01	5.6b	2.3ab	5.9c	2.1bc
B3	0.4			0.01	5.6b	2.4a	5.3de	2.3ab
B4	0.5			0.01	5.0c	1.0e	4.9f	1.5de
B5		0.1		0.01	3.0e	1.2de	3.5g	1.2f
B6		0.3		0.01	6.5a	2.5a	5.5d	2.0c
B7		0.5		0.01	5.6b	2.1bc	6.3b	2.4a
B8		0.8		0.01	5.2c	1.9c	5.0ef	1.5e
B9			0.01	0.01	4.3d	1.0e	5.0ef	1.8cd
B10			0.02	0.01	5.3bc	1.5d	6.6a	2.6a
B11			0.03	0.01	6.2a	2.4a	6.1bc	2.0c
B12			0.05	0.01	5.0c	2.0bc	6.0c	1.8cde

2.3 不定芽的生根

切取大于 2 cm 高的不定芽转入生根培养基中进行生根诱导,5 d 后不定芽基部有白色突起,8 d 后形成白色的小根。30 d 后 5 种培养基的生根情况见表 3。在未添加 NAA 的培养基中,也可生根,但生根率较低,“圣香”苦瓜生根率为 55.4%,“玉华”苦瓜生根率为 52.3%。添加不同浓度的 NAA 后,苦瓜不定芽的生根率明显提高,根数增多,根长增长。在 NAA 浓度为

0.05 mg/L 时,“圣香”苦瓜生根率达 90.7%,“玉华”苦瓜生根率达 91.9%,显著高于其它处理组合。而且生根整齐,健壮,须根较多,多呈辐射状伸长。在 NAA 浓度为 0.10 mg/L,平均根数有所增多,但生根率下降,而且根系短粗,须根较少。因此 NAA 浓度为 0.05 mg/L 时,“圣香”苦瓜和“玉华”苦瓜不定芽生根的效果最好。

3 讨论与结论

植物形态发生过程中,生长调节剂是重要的调控

表 3 NAA 对不定芽生根的影响

Table 3 Effect of NAA on root regeneration of adventitious bud

NAA /mg·L ⁻¹	“圣香”苦瓜 ‘Shengxiang’			“玉华”苦瓜 ‘Yuhua’		
	生根率 Rate of root/%	平均根数 No. of roots per shoot/条	根长 Root length /cm	生根率 Rate of root/%	平均根数 No. of roots per shoot/条	根长 Root length /cm
0	55.4e	3.0c	1.5d	52.3e	3.3c	1.8c
0.01	79.8c	5.3b	2.1c	77.8c	4.5b	2.3b
0.05	90.7a	6.7a	3.0a	91.9a	6.3a	2.8a
0.10	84.9b	7.1a	2.5b	86.2b	6.5a	2.2b
0.15	65.1d	5.5b	2.0c	62.8d	5.1b	1.8c

因素。该研究表明,苦瓜易形成愈伤组织,这与前人的研究结果一致^[2-6]。不同培养基上愈伤组织的诱导率都达到 80%以上,说明苦瓜愈伤组织的形成过程中对激素的种类和浓度不敏感。宋莉英等^[9]研究认为苦瓜外植体中生长素含量较高,而细胞分裂素含量过低是苦瓜易于产生愈伤组织的原因。而苦瓜不定芽的分化受细胞分裂素的影响较大,在生长素浓度不变的情况下,不同种类和浓度的细胞分裂素不定芽分化率差异较大,总的来看 ZT、TDZ 对 2 个苦瓜品种不定芽的诱导效果优于 6-BA。说明细胞分裂素是苦瓜不定芽发生的主要调节者。宋莉英等^[9]研究认为培养基中添加 ZT 和 KT 是非常重要的,而添加 6-BA 未能有效的诱导出不定芽。而李靖等^[11]研究认为在不定芽的诱导过程中,6-BA 的效果明显好于 KT。杨满业在诱导培养基中加入 6-BA 和 KT 成功的诱导出不定芽^[6]。该试验中“圣香”苦瓜、“玉华”苦瓜子叶在同一培养基中的不定芽诱导率之间存在差异。因此选择再生频率高的基因型、适宜的生长调节剂的种类、浓度及其配比对苦瓜不定芽的诱导是非常重要的。

该试验中“圣香”苦瓜、“玉华”苦瓜在 NAA 浓度为 0.05 mg/L,生根率最高,生根效果最好,随着 NAA 浓

度升高生根率开始下降。而王小荣等^[5]报道当 NAA 浓度为 0.5 mg/L 时生根率达 100%。这可能是不同基因型苦瓜的内源生长素水平不一样。总之,苦瓜属于难以再生的作物,许多因素影响着苦瓜离体培养植株再生过程。仍需要对影响苦瓜离体培养再生的因素及机制进行深入探索,以促进苦瓜离体培养的研究。

参考文献

[1] 唐琳,陈放,贾勇炯. 苦瓜的离体繁殖[J]. 植物生理学通讯,1997, 33(2):126-127.
[2] 潘绍坤,王永清. 苦瓜离体快速繁殖技术体系的研究[J]. 北方园艺,2006(4):148-150.
[3] Sultana R S, Miah M A. Aseptic multiplication and maintenance of bitter gourd(*Momordica charantia* Linn.) as affected by sucrose, agar and pH[J]. Journal of Biological Sciences, 2005, 5(6):781-785.
[4] 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.
[5] 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):76-78.
[6] Yang M Y, Zhao M J, Zeng Y. Establishment of in Vitro Regeneration System of Bitter Melon(*Momordica charantia* L.)[J]. High Technology Letters, 2004, 10(1):44-48.
[7] Islam R, Sarkar K P, Naderuzzaman A. In vitro vegeneration of plant from cotyledons of *Momordia charantia* L. [J]. Plant Tissue Culture, 1994, 4(2):105-109.
[8] Hoque A, Islam R, Arima S. High frequency plant regeneration from cotyledon derived callus of *Momordica dioica* (Roxb) wild [J]. Phytomorphology, 2000, 50:3-4, 267-272.
[9] 宋莉英. 苦瓜离体植株再生体系的建立[D]. 重庆:西南师范大学,2004.
[10] 宣朴,陈新,岳春芳,等. 苦瓜愈伤组织再生植株研究[J]. 西南农业学报,2006,19(5):940-942.
[11] 李靖,李焕秀,李敏. ‘翠妃’苦瓜子叶不定芽诱导的研究[J]. 北方园艺,2007(10):181-183.
[12] Thiruvengadam M, Mohamed S V, Yang C H, et al. Development of an embryogenic suspension culture of bitter melon(*Momordica charantia* L.)[J]. Scientia Horticulturae, 2006, 109(2):123-129.

Establishment of Regeneration System *in vitro* for Cotyledon of *Momordica charantia* L.

ZHENG Yang-xia, LI Huan-xiu, YAN Ze-sheng, QIN Yao-guo, HE Zhong-qun
(College of Horticulture, Sichuan Agricultural University, Ya'an, Sichuan 625014)

Abstract: Using cotyledon as explants, tissue culture and plant regeneration of *Momordica charantia* L. had been studied. The results showed that explants of *Momordica charantia* L. were easily induced to grow callus. The rate of callus formation were above 80%. MS medium supplemented with TDZ 0.05 mg/L+NAA 0.02 mg/L was best for bud induction of ‘Shengxiang’ in which the induction rate was 68.4%. The best bud regeneration medium of ‘Yuhua’ was MS+TDZ 0.03 mg/L+NAA 0.02 mg/L in which the induction rate was 67.8%. The most appropriate medium for multiplication of cluster buds of ‘Shengxiang’ was MS+ZT 0.3 mg/L+NAA 0.01 mg/L. The coefficient of multiplication 6.5. MS medium containing TDZ 0.02 mg/L+NAA 0.01 mg/L gave best result for cluster buds of ‘Yuhua’ in which the rate of multiplication was 6.6. 1/2MS medium containing NAA 0.05 mg/L was best for root induction and the rate of rooting for ‘Shengxiang’ and ‘Yuhua’ was 90.7% and 91.9%, respectively.

Key words: *Momordica charantia* L.; cotyledon; plant regeneration