

苦瓜离体再生体系建立的研究

武 鹏¹, 方 锋 学², 黄 如 葵³, 黄 熊 娟³, 陈 小 凤³

(1. 广西农业科学院 广西现代农业科技示范园, 广西 南宁 530007; 2. 广西农业科学院 甘蔗研究所, 广西 南宁 530007;

3. 广西农业科学院 蔬菜研究所, 广西 南宁 530007)

摘 要:以 MS 为基本培养基, 附加不同浓度的激素组合进行苦瓜离体再生体系的研究。结果表明:种子去壳洗净浸泡 5 min, 用 70% 酒精浸泡 1 min, 洗净后 0.1% HgCl₂ 消毒 10 min 的灭菌效果最好; 通过愈伤组织诱导不定芽没有取得成功; 利用无菌苗不同部位直接诱导不定芽, 子叶节效果最好, 最高诱导率达到 100%, 最适宜诱导培养基是 MS+6-BA 2 mg/L+IBA 0.02 mg/L 和 MS+6-BA 4 mg/L+IBA 0.01 mg/L; 最适生根培养基为 1/2MS+IBA 0.2 mg/L。

关键词:苦瓜; 离体培养; 愈伤组织; 不定芽

中图分类号:S 642.503.6 **文献标识码:**B **文章编号:**1001-0009(2012)02-0124-03

苦瓜(*Momordica charantia* L.) 属于葫芦科苦瓜属 1a 生蔓生草本植物, 又称凉瓜、锦荔枝、红姑娘、癞瓜、红羊等, 起源于印度和缅甸, 现广泛分布于热带、亚热带和温带地区, 在印度、日本和东南亚栽培历史悠久。苦瓜作为蔬菜作物主要以食用嫩瓜为主, 具有较高的营养价值, 同时还具有很高的药用价值。近年来, 有关苦瓜组织培养方面的研究虽日益增多^[1-17], 但现有的苦瓜离体再生体系并不适于离体遗传转化, 因此, 该试验通过苦瓜的种子无菌萌发, 研究适合于苦瓜离体遗传转化的再生体系, 为今后通过现代生物技术培育苦瓜优良品种或创造新种质提供理论依据和技术支持。

第一作者简介:武鹏(1978-), 男, 硕士, 助理研究员, 现从事蔬菜育种与栽培研究工作。E-mail: wupeng@gxaas.net。

基金项目:广西农业科学院基本科研业务专项资助项目(200815(基))。

收稿日期:2011-11-10

1 材料与方法

1.1 试验材料

苦瓜自交系‘MC9’和‘MC42’, 由广西农业科学院蔬菜研究所提供。

1.2 试验方法

MS 培养基和 1/2MS 培养基(MS 培养基大量元素用量减半), 蔗糖 20 g/L, 琼脂 10 g/L, pH 5.8。培养温度为(28±1)℃, 光照强度为 2 000 lx, 每日光照 14 h, 黑暗 10 h。

1.2.1 种子无菌萌发 用以下 3 种处理方式去种壳: (1)55℃温水浸种 10 min, 然后室温浸泡 24 h, 在超净台上用 0.1% HgCl₂ 消毒 10 min, 无菌水洗净待用; (2)在超净台上用 10% NaClO₄ 浸泡 15 min, 无菌水洗净待用; (3)用水浸泡 5 min, 在超净台上用 70% 酒精泡 1 min, 洗净后 0.1% HgCl₂ 消毒 10 min, 无菌水洗净待用。把消毒好的种子接种于 MS 培养基中, 各接 6 瓶, 每瓶 5 粒, 放入培养箱, 10 d 后统计污染率和发芽率。比较各种消

Karyotype Analysis of *Ottelia acuminata* var. *songmingensis* Z. T. Jiang

GUO Qing¹, ZHAI Shu-hua¹, XIONG Ji-hui¹, HUANG Ding-xing²

(1. Department of Life Science and Technology, Kunming College, Kunming, Yunnan 650031; 2. 30th Middle School of Kunming, Kunming, Yunnan 650031)

Abstract: Taking *Ottelia acuminata* var. *songmingensis* Z. T. Jiang which grows in Yunnan, China as the material. The chromosome number and karyotype ($2n = 2x = 22 = 12m + 8sm + 2st$) were studied. The results showed that the karyotype belongs of *Ottelia acuminata* var. *songmingensis* to ‘2B’ and was very similar to that of the *Ottelia*. This was for further study of the water turtle evolution of the genus *Kehai Ottelia acuminata* provides important cytological data for the sea to provide a new variety of cauliflower cytological basis.

Key words: *Ottelia acuminata* var. *songmingensis*; chromosome; karyotype

毒方式的效果及苗的生长状况,得出最适处理方式。

1.2.2 不同激素种类、浓度对不定芽的诱导试验 愈伤组织诱导不定芽:将愈伤组织切成 5 mm×5 mm 的小块,分别接种到不同的培养基上,30 d 后,统计不定芽诱导率。直接诱导不定芽:将无菌苗上胚轴、下胚轴切成 5 mm 长小段,子叶切成 5 mm×5 mm 小块,分别接种于附加不同激素的 MS 培养基上。将上述切除上胚轴、下胚轴和子叶剩下的子叶节接种到添加不同浓度的 6-BA 和 IBA 的培养基中。2 周后统计不定芽诱导情况。

1.2.3 生根培养 以 MS 和 1/2MS 为基本培养基,不添加任何激素,比较 2 种培养基对生根的影响;并在筛选出的培养基中添加不同浓度的 IBA,选出适合试管苗生根的培养基。

1.2.4 练苗移栽 将生根良好的无菌苗置于室温 2~3 d,然后除去瓶盖,加入少量水,以刚刚没过培养基为好,置于室温 2~3 d;将组培苗取出,洗净残留培养基,用 800 倍的多菌灵溶液消毒 10 min,移栽入无菌营养土,浇透定根水,15 d 后统计移栽成活率。

2 结果与分析

2.1 种子的无菌萌发

从表 1 可看出,2 种不同基本培养基和暗处理对种子的发芽率影响不大,关键是灭菌的方式。方法(2)和方法(3)种子发芽率最高,且没有污染,方法(3)的发芽率全部达到 100%,而方法(1)污染率高,且发芽率下降,原因可能是种子浸泡后细菌已经侵入种子内部,表面消毒不能达到效果,种子浸泡 24 h 后已经开始萌动,灭菌处理对种子造成了伤害从而降低了发芽率。因此最佳灭菌方式是种子去壳洗净浸泡 5 min,在超净台上用 70% 酒精泡 1 min,洗净后 0.1% HgCl₂ 消毒 10 min。

表 1 不同处理对苦瓜无菌苗发芽率的影响

方法	培养基	暗处理/d	种子数/个	发芽率/%	污染率/%
(1)	MS	0	15	73.3	66.7
		5	15	53.3	100.0
	1/2MS	0	15	80.0	86.7
		5	15	33.3	46.7
(2)	MS	0	15	86.7	0.0
		5	15	100.0	0.0
	1/2MS	0	15	100.0	0.0
		5	15	100.0	0.0
(3)	MS	0	15	100.0	0.0
		5	15	100.0	0.0
	1/2MS	0	15	100.0	0.0
		5	15	100.0	0.0

2.2 不同激素种类、浓度对不定芽的诱导影响

由表 2 可看出,在培养基 A1~A9 上均未分化出不定芽。原因可能是品种基因型、激素配比不适宜(如生长素浓度过高,细胞分裂素浓度过低)、培养基其它成分、培养条件不利于分化等所致。

表 2 不同浓度 KT、ZT 配组对 MC9 和 MC42 愈伤组织分化的影响

处理	激素种类和浓度/mg·L ⁻¹		不定芽诱导率/%	
	KT	ZT	MC42	MC9
A1	0.5	3.5	0	0
A2	0.5	3.5	0	0
A3	0.5	3.5	0	0
A4	1.0	4.0	0	0
A5	1.0	4.0	0	0
A6	1.0	4.0	0	0
A7	1.5	4.5	0	0
A8	1.5	4.5	0	0
A9	1.5	4.5	0	0

从表 3 可看出,MC9 在接种 30 d 后上胚轴和子叶外植体都获得了不定芽,但诱导率较低,最高诱导率达到 13.3%。而 MC42 在 9 种培养基中均没有不定芽发生。由此可见,采用上胚轴、下胚轴、子叶进行不定芽诱导虽然比通过愈伤组织诱导不定芽容易,但诱导率低。

表 3 苦瓜不定芽诱导的试验结果

处理	ZT	KT	外植体	MC9		MC42	
	/mg · L ⁻¹	/mg · L ⁻¹		接种数	诱导率/%	接种数	诱导率/%
1	3.5	0.5	上胚轴	25	8.0	30	0
2	3.5	1.0	子叶	30	0.0	30	0
3	3.5	1.5	下胚轴	24	0.0	30	0
4	4.0	0.5	子叶	30	3.3	30	0
5	4.0	1.0	下胚轴	26	0.0	30	0
6	4.0	1.5	上胚轴	30	0.0	30	0
7	4.5	0.5	下胚轴	24	0.0	30	0
8	4.5	1.0	上胚轴	30	13.3	30	0
9	4.5	1.5	子叶	30	3.3	30	0

由表 4 可看出,当 IBA 浓度为 0.01 mg/L 时,较高浓度的 6-BA 有利于子叶节不定芽的诱导,但是当 IBA 浓度为 0.02 mg/L 时,不定芽诱导率随着 6-BA 浓度升高而下降。处理 3 和 4 的诱导率最高达 100%。由此可见,通过子叶节诱导不定芽的最适宜培养基是 MS+6-BA 2 mg/L+IBA 0.02 mg/L 和 MS+6-BA 4 mg/L+IBA 0.01 mg/L。

表 4 苦瓜子叶节诱导不定芽的试验结果

处理	6-BA/mg·L ⁻¹	IBA/mg·L ⁻¹	接种数	诱导率/%
1	2.0	0.01	9	88.9
2	3.0	0.01	9	88.9
3	4.0	0.01	9	100.0
4	2.0	0.02	9	100.0
5	3.0	0.02	9	66.7
6	4.0	0.02	9	33.3

2.3 试管苗的生根

由表 5 可看出,基本培养基 1/2MS 比 MS 更有利于试管苗的生根。在 1/2MS 培养基中添加一定浓度的生长激素 IBA,可以明显提高生根率。当 IBA<0.4 时,生根率都达到了 100%,且根数随着 IBA 浓度的升高呈现出先上升后降低的趋势。其中,当 IBA 浓度为 0.20 mg/L 时,平均根数最多,为 10 条,且根长势和苗长势都达到最好。综合看来,最佳生根培养基是 1/2MS+IBA 0.2 mg/L。

表 5 苦瓜不定根诱导结果

培养基	接种数	生根率/%	平均根数
MS	10	86.56	5.0
1/2MS	10	97.42	8.0
1/2MS+IBA 0.1 mg/L	5	100.0	5.0
1/2MS+IBA 0.2 mg/L	6	100.0	10.0
1/2MS+IBA 0.3 mg/L	6	100.0	9.5
1/2MS+IBA 0.4 mg/L	6	66.7	9.5

2.4 试管苗移栽

当苦瓜的根长到 2 cm 左右即可进行练苗移栽。每天早晚浇少量的水,15 d 后,统计成活率,为 95%。

3 结论与讨论

建立苦瓜的离体再生体系最佳的种子灭菌处理方法是:种子去壳洗净浸泡 5 min,用 70%酒精泡 1 min,洗净后 0.1% HgCl₂ 消毒 10 min。MS 培养基和 1/2MS 培养基上的种子发芽率没有差异,暗培养时间,对提高种子的发芽率也没有明显的作用。

利用愈伤组织进行不定芽诱导没有获得成功,原因可能与品种基因型、激素浓度配比不适宜、愈伤组织的继代培养次数过多,影响了愈伤组织的分化能力有关。在上胚轴、下胚轴和子叶直接诱导不定芽的试验中,以 ZT 和 KT 配合使用,2 个品种均成功地诱导出不定芽。这可能是苦瓜内源生长素含量高,直接用细胞分裂素进行诱导反而较容易产生不定芽,但诱导率很低。而采用 6-BA 和 IBA 组合时,利用子叶节进行诱导不定芽效果最好,最高的诱导率达到 100%。最佳诱导培养基是 MS+6-BA 2 mg/L+IBA 0.02 mg/L 和 MS+6-BA 4 mg/L+IBA 0.01 mg/L。这说明苦瓜的不定芽诱导不仅受基因型影响,同时也与不同外植体有关,不同外植体在诱导不定芽能力上是存在差别的。生根是获得完整植株的重要环节,由于在诱导不定芽过程中使用了较高浓度的细胞分裂素,其苗中尚保存着一定的量,因此在生根培养时一般不需要添加细胞分裂素,而生长素是

必需的。该试验最佳生根培养基是 1/2MS+IBA 0.2 mg/L。

参考文献

- [1] 王国莉,李希陶. 苦瓜离体再生体系建立的研究[J]. 安徽农业科学, 2008,36(11):4408-4410.
- [2] 石若夫,王翔,王玮. 长白大苦瓜高效再生系统的建立[J]. 生物技术, 2007,17(4):89-91.
- [3] 冯锐,张慧英,刘百龙. 苦瓜试管苗的快速繁殖[J]. 北方园艺, 2007(3):165-166.
- [4] 潘绍坤,杜晓荣,屈小江. 不同激素组合对苦瓜不定芽诱导的影响[J]. 安徽农业科学, 2007,35(22):6760-6761.
- [5] 李靖,李焕秀,李敏翠. 翠妃苦瓜子叶不定芽诱导研究[J]. 北方园艺, 2007(10):181-183.
- [6] 林义章,罗燕华,张志忠. 苦瓜子叶节丛生芽的诱导[J]. 热带作物学报, 2006,27(2):60-63.
- [7] 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]. 湖南师范大学学报(自然科学版), 2003,26(4):76-78.
- [8] 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.
- [9] 宋莉英,谭净,高峰. 苦瓜愈伤组织诱导的多因子正交试验研究[J]. 西南师范大学学报, 2004,29(3):462-465.
- [10] 宣朴,岳春芳,李跃建,等. 苦瓜愈伤组织再生植株[J]. 植物生理学通讯, 2003,39(6):633.
- [11] 杨满业,赵茂俊,苗琛,等. 苦瓜营养器官愈伤组织发生的比较研究[J]. 四川大学学报, 2002,39(6):1155-1156.
- [12] 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.
- [13] 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, 1999,36(1):144-147.
- [14] 黄勇,汤青林,宋明. 苦瓜组织培养体系的研究[J]. 西南农业学报, 2007,20(4):860-863.
- [15] 王国莉,范红英,林润银,等. 不同基因型苦瓜离体植株再生体系的建立[J]. 安徽农业科学, 2008,36(28):12125-12127.
- [16] 宋莉英,高峰. 苦瓜离体培养过程中内源激素含量的变化[J]. 植物学通讯, 2006,23(2):192-196.
- [17] 张丽,李玉峰,代娟. 苦瓜愈伤组织的诱导及培养条件优化[J]. 食品与生物技术学报, 2007,26(3):116-120.

Study on the Establishment of *in vitro* Regeneration System in *Momordica charantia* L.

WU Peng¹, FANG Feng-xue², HUANG Ru-kui³, HUANG Xiong-juan³, CHEN Xiao-feng³

(1. Guangxi Demonstration Park of Modern Agricultural Science and Technology, Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanning, Guangxi 530007; 2. Sugarcane Research Institute, Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanning, Guangxi 530007; 3. Vegetable Research Institute, Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanning, Guangxi 530007)

Abstract: *In vitro* regeneration system of *Momordica charantia* L. based on MS medium with various concentration of hormone combinations were studied. The results showed that the most effective disinfection was reached when the clean peeled seeds were soaked for 5 min, 70% ethanol for 1 min and rinsing before HgCl₂ treatment for 10 min. Adventitious buds induction with callus was failed, while cotyledonary node reached 100% induction rate among all the parts of the sterile seedling and the optimum induction medium were MS+6-BA 2 mg/L+IBA 0.02 mg/L and MS+6-BA 4 mg/L+IBA 0.01 mg/L and the optimum root medium was 1/2MS+IBA 0.2 mg/L.

Key words: *Momordica charantia* L.; *in vitro* culture; callus; adventitious bud