

# 田间“碧秀”苦瓜茎段离体启动培养的研究

刘玉晗, 王永清, 秦红梅

(四川农业大学 林学院园艺学院 四川 雅安 625014)

**摘要:**以田间优株健壮苦瓜枝条茎段为外植体,分别对比了不同消毒方法,不同材料部位,不同季节取材,不同激素处理以及丝瓜伤流液对苦瓜茎段不定芽启动培养的影响。结果表明:6~8 min 为最佳消毒时间,外植体取材时间最好在6~7月,其次为5月,以枝条中部材料为宜;高浓度的6-BA有利于苦瓜再生芽的诱导;附加丝瓜伤流液,可以显著提高芽体的启动时间及萌发率,以10%最佳。

**关键词:** 苦瓜;离体培养;启动培养;伤流液

**中图分类号:** S 642.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2008)11-0148-03

苦瓜(*Momordica charantia* Linn.)为葫芦科苦瓜属1a生或2a生攀援草本植物,葫芦科中最重要的种类之一<sup>[1]</sup>。因果实含多种人体必需的维生素和微量元素<sup>[2]</sup>常作为一种营养价值很高的蔬菜食用。另外很多地区一直作为民族中草药使用<sup>[3]</sup>,现代医学也证明,苦瓜具有降低血糖、抗肿瘤以及提高人体免疫力等作用<sup>[4]</sup>。因此苦瓜作为一种药食两用植物有着重要的研究价值。

随着苦瓜食用、药用价值的开发,对优良品种的需求越来越大。而苦瓜因其制种程序复杂,导致F<sub>1</sub>杂交种子价格昂贵且供不应求。通过离体培养方法快速繁殖苦瓜优良品种种苗,可降低种苗成本,缓解这一问题。而且随着分子育种研究的发展,苦瓜高效离体培养再生体系的建立也成为重要性状遗传转化的基础与关键环节。该试验以田间优株苦瓜枝条的节段为外植体,首次研究了不同消毒方法,不同激素处理,不同取材部位,不同季节取材以及丝瓜伤流液对苦瓜茎段不定芽启动培养的影响,以期以后苦瓜快繁体系的建立提供理论和技术基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料

以四川农业大学脱毒中心园地采集的优株“碧秀”苦瓜枝条为试材。种苗由农友种苗股份有限公司提供。

### 1.2 材料的预处理

选取苦瓜生长旺盛的枝条,去除表面污垢后剪成带3、4个芽的节段。用毛笔蘸肥皂水轻轻刷洗后,用肥皂水浸泡10~20 min,流水冲洗30 min,而后在超净工作台

进行表面灭菌。表面消毒剂采取0.1%升汞对比不同消毒时间的消毒效果,每个处理3次重复。

### 1.3 培养基激素

启动培养基选用MS为基本培养基,附加BA、KT、NAA、IBA和IAA等植物生长调节剂。采用L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>)设计,每处理重复3次(表2)。

### 1.4 丝瓜伤流液采集

用于采集伤流液的丝瓜为普通肉丝瓜的一个品种按通常栽培方法种植。当丝瓜藤蔓进入结瓜旺盛期即可采集伤流液。采集方法参考张承妹<sup>[5]</sup>所述方法。伤流液浓度设置以下5个处理,即:对照、10%丝瓜伤流液(v/v,下同)、15%、20%、25%、30%。

### 1.5 其它

所有培养基都含3%蔗糖,0.65%琼脂,pH 5.7~5.8 121℃高压灭菌20 min。培养条件为温度(23±2)℃,空气相对湿度为60%左右,光照强度为1500~2000 lx,光照时间为14 h/d。

### 1.6 结果统计

污染率在接种后10~15 d内统计,萌芽率在培养30 d后统计。污染率=(污染外植体数/接种总外植体数)×100%。萌发率=(萌发个数/存活个数)×100%。

## 2 结果与分析

### 2.1 表面消毒剂处理的最佳时间

由表1可知,所有茎段都有不同程度的污染现象。不同部位茎段的外植体,其适合的消毒时间不同;同一部位外植体随消毒处理时间的增加,污染率不断下降,但外植体死亡率也随之上升,尤其顶端材料消毒8 min以上后,死亡率接近100%。

方差分析表明,基部材料外植体不同消毒时间的污染率差异显著性不明显;中部材料外植体随消毒时间的增加,污染率有显著性的差异,消毒时间为6~8 min,其

第一作者简介:刘玉晗(1981-),女,湖南绥宁人,在读硕士,主要从事蔬菜组织培养工作。E-mail: xiaohanyu\_2001@yahoo.com.cn.

通讯作者:王永清。E-mail: yqw14@sicau.edu.cn.

收稿日期:2008-05-31

灭菌效果无明显差异; 顶端材料消毒时间为6 min 与 4 min 有显著差异, 但与 5 min 无明显差异。以上结果表明, 苦瓜外植体来源以枝条中部材料为佳, 0.1% 升汞消毒 6 min 就可达到灭菌目的。

表 1 升汞消毒时间对外植体污染率的影响

消毒时间 / min	污染率/ %		
	基部	中部	顶端
4	96. 15a	95. 83a	82. 35a
5	90. 91ab	82. 61b	70. 59ab
6	83. 87abc	66. 67c	61. 11b
7	77. 27bc	59. 26c	56. 25b
8	78. 57bc	60. 71c	—
9	72. 73bc	43. 75d	—
10	67. 57c	32. 43d	—

注 用 LSD 多重比较测验, 带同样字母表示在 0.05 水平上无显著差异。

2.2 不同激素对外植体启动的影响

表 2 列出了培养基中的激素组成对 6 月份取材的枝条中段腋芽萌发的影响。由表 3 可知, 6-BA 的 F=32. 593, P=0.030<0.05, 差异显著。这说明 BA 对芽诱导率有显著影响, 有必要进一步对 BA 不同浓度的均值进行多重比较。由表 4 可知, 6-BA 3 水平和 BA 1、2 水平有显著的差异, 6-BA 1 与 2 水平在同一组内, 所以差异不显著。试验中, 因素的主次顺序为: A B C, 由表 3 知, 最优方案为 A<sub>3</sub>B<sub>3</sub>C<sub>1</sub>。这一方案在试验中并没有出现, 与之相近的是 9 号试验 A<sub>3</sub>B<sub>3</sub>C<sub>2</sub>, 是 9 个试验中最好的一个。因此选择 MS+6-BA 4 mg/ L+IBA 0.1 mg/ L 作为芽诱导培养基。

表 2 不同激素对外植体芽诱导率的影响

编号	激素组合			接种数 / 个	出芽数 / 个	芽诱导率 / %
	6-BA	生长素	生长素浓度			
	/ mg · L <sup>-1</sup>	种类	/ mg · L <sup>-1</sup>			
1	2	NAA	0. 1	39	0	0.00f
2	2	IAA	0. 2	40	0	0.00f
3	2	IBA	0. 3	42	2	4. 76e
4	3	NAA	0. 2	43	0	0.00f
5	3	IAA	0. 3	44	4	9.09d
6	3	IBA	0. 1	37	9	24. 32c
7	4	NAA	0. 3	39	9	23. 08c
8	4	IAA	0. 1	43	12	27. 9b
9	4	IBA	0. 2	41	17	41. 46a

注 用 LSD 多重比较测验, 带同样字母表示在 0.05 水平上无显著差异。

表 3 不同激素对外植体芽诱导率的方差分析结果

变异来源	II型平方和 SS	自由度	均方 MS	F 值	P 值	优方案
校正模型	1 889. 509(a)	6	314. 918	15. 632	0. 061	
1 截距	2 858. 247	1	2 858. 247	141. 877	0. 007	
6-BA	1 313. 249	2	656. 624	32. 593	0. 030	A3
生长素种类	485. 672	2	242. 836	12. 054	0. 077	B3
生长素浓度	90. 588	2	45. 294	2. 248	0. 308	C1
误差	40. 292	2	20. 146			
总和	4 788. 048	9				
校正总和	1 929. 801	8				

2.3 不同季节取材对外植体启动培养效果的影响

试验对比了不同季节取材对外植体污染率及腋芽

萌发的影响。由表 5 可知, 各月份污染率差异不大, 只有 9 月和 5 月存在显著差异。从诱导率来看, 6、7 月外植体诱导率显著高于 9 月诱导率, 外植体污染相对较低。从萌发时间看, 7 月最初萌芽时间开始最早, 与 5、8、9 月构成显著差异。综合认为, 选择在 6、7 月取材最合适。

表 4 BA 各浓度间均数的两两比较(S-N-K 法)

BA	N	自变量组	
		1	2
1	3	4. 201461	
2	3	15. 699776	
3	3		33. 561336
P 值		0. 088	1. 000

表 5 不同季节取材对苦瓜外植体启动培养效果的影响

调查项目	取材季节				
	5 月	6 月	7 月	8 月	9 月
污染率/ %	34. 69b	46. 94ab	44. 62ab	41. 89ab	56. 96a
萌发率/ %	28. 57ab	34. 29a	37. 93a	21. 43ab	14. 29b
萌发时间/ d	14~ 15a	10~ 12ab	6~ 10b	12~ 14a	11~ 18a

注: 用 LSD 多重比较测验, 带同样字母表示在 0. 05 水平上无显著差异。

2.4 丝瓜伤流液对外植体启动培养效果的影响

在加有丝瓜伤流液的诱导培养基上, 外植体在接种后 5~6 d 茎段腋间处就开始出现芽体萌动, 而对照则是 11 d 后才出现, 所有处理萌芽时间与对照均形成显著差异。由表 6 可知, 培养基中加入 10%、15%、20% 浓度丝瓜伤流液, 其腋芽萌发率与对照相比, 均达到显著差异, 且 10% 浓度也与 5% 和 25% 浓度形成显著差异。在后期芽体生长观察过程中发现, 高浓度的伤流液对外植体愈伤组织的发生也有明显促进作用, 后期甚至抑制已萌发芽体的生长。因此认为选择 10% 的伤流液作为苦瓜初代诱导培养基的有机添加剂是最合适的。此处理下外植体愈伤发生适当, 芽伸长快, 而且还出现一个腋间处萌发 2 个芽体现象。

表 6 丝瓜伤流液对外植体萌芽的影响

伤流液浓度 (V/ V)	接种外植体数 / 个	萌芽数 / 个	萌芽率 / %	萌芽时间 / d
0%	35	10	28. 5c	11~ 16a
5%	36	15	41. 67bc	7~ 9b
10%	31	19	61. 21a	6~ 8b
15%	29	17	58. 52ab	5~ 7b
20%	30	16	52. 02ab	6~ 7b
25%	32	13	40. 91bc	6~ 7b

注: 用 LSD 多重比较测验, 同样字母在 0.05 水平上无显著差异。

3 结论与讨论

多数情况下, 植物快繁的初代培养材料取自自然生长的植株, 都带有各种各样的微生物, 只有对这些材料进行成功的消毒, 才能建立起高效培养系统。因此找出合适的消毒时间对材料的建立是非常重要的。该试验也是以田间生长健壮的苦瓜植株为外植体来源, 因为苦瓜表面被覆茸毛, 消毒难以彻底进行, 因此无菌外植体

的建立是离体快繁技术体系的基础。对各部位材料及不同消毒时间试验发现, 枝条中部材料带菌最少, 消毒时间控制在 6~8 min 为宜。分析原因可能基部外植体接近木质化, 长期暴露在空气中, 带菌较多, 且有一定内生菌, 消毒难彻底; 顶端外植体由于表面被覆茸毛, 消毒剂难以彻底进入内部。

研究用带芽苦瓜节段为材料进行离体快繁的启动试验, 试验过程中发现愈伤组织非常容易形成, 与前人结论是一致的<sup>[69]</sup>。在初代培养中, 除材料自身性质外, 外植体能否顺利萌发与培养基中外源激素的种类和浓度有很大关系。在诱导不定芽萌发过程中发现, 诱导率与材料本身关系很大, 即使是同配方培养基, 材料的个体表现差异也非常大, 只有合适的外植体配合适合的外源激素才能得到理想的诱导效果。综合不同时期外植体的萌芽率、污染率以及开始萌芽时间, 认为外植体的取材时间最好在 6~7 月, 其次为 5 月, 选用枝条的中部为宜。推测原因是 6~7 月正值芽体开始萌动, 内源激素起着主导作用, 培养基外源激素才可以配合内源激素, 较快促进腋芽萌发并分化成丛生芽。激素筛选的结果表明, 高浓度的细胞分裂素有利于苦瓜再生芽的诱导。这与前人结论是一致的<sup>[1013]</sup>。

为提高植株的诱导率和绿苗分化率, 很多天然植物提取物, 如椰子、番茄、西瓜、落地生根等汁液已被广泛应用于植物组织培养研究。植物伤流液含有多种类生长激素和生长物质, 张承妹等<sup>[5]</sup>研究发现, 丝瓜伤流液可以提高水稻花粉愈伤组织的诱导率以及绿苗分化率。紫外光谱测定认为丝瓜伤流液含有类似细胞激动素以及培养基中的有机生长物质。在苦瓜启动培养中附加丝瓜伤流液也得到类似结果, 芽体启动时间显著提前,

外植体愈伤发生量多, 以 10% (V/V) 最佳。研究首次应用在苦瓜上, 取得不错诱导效果, 可值得以后苦瓜离体培养借鉴。

### 参考文献

- [1] 黄泰康, 丁志遵, 赵守训, 等. 现代本草纲目(上卷)[M]. 中国医药科技出版社, 2000.
- [2] 彭爱芝, 李劲. 苦瓜中氨基酸和无机元素的含量分析[J]. 湖南医科大学学报, 1996, 21(4): 305-307.
- [3] Beloin N, Gbeassor M, Akpagana K, et al. Ethnomedicinal uses of *Momordica charantia* (Cucurbitaceae) in Togo and relation to its phytochemistry and biological activity[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2005, 96(1-2): 49-55.
- [4] 许红心, 倪坚军. 苦瓜的药用研究概况[J]. 浙江中医学院学报, 2001, 25(4): 73-75.
- [5] 张承妹, 章振华. 应用丝瓜伤流液提高水稻花药培养效果[J]. 作物学报, 1991, 17(5): 352-361.
- [6] 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.
- [7] 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(自然科学版), 2002, 39: 1155-1156.
- [8] 宋莉英, 谭铮, 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(自然科学版), 2004, 29(3): 462-465.
- [9] 张丽, 李玉锋, 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): 116-120.
- [10] 唐琳, 苟小平, 陈放, 等. 离体培养无性繁殖苦瓜[J]. 四川大学学报(自然科学版), 1999, 36(1): 144-147.
- [11] 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.
- [12] 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.
- [13] 黄勇, 汤青林, 宋明. 苦瓜组织培养体系的研究[J]. 现代园艺, 2007(1): 5-7.

## Stem Segments Induction Culture from Field Grown Plants of Bitter Gourd (*Momordica charantia* Linn.)

LIU Yu-han, WANG Yong-qing, QIN Hong-mei

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

**Abstract:** Effects of different sterilization methods, different shoot position and sampling time, different concentrations of hormones in the medium and different levels of exudates of loofa on in vitro axillary shoot induction of *Momordica charantia* Linn. were studied in the present investigation. The nodal segments from the field grown plants were used as testing plant material. 6~8 min in the 0.1% HgCl<sub>2</sub> was the optimal surface sterilization time. June or July proved to be better for material taking, followed by May. Middle parts of the shoot in MS medium containing 3.0 or 4.0 mg/L 6-BA showed highest response in shoot induction culture. Exudate of loofa greatly shortened the explant induction time and the highest induction percentage was observed on the medium added 10 % (v/v) exudate of loofa.

**Key words:** Bitter gourd; In vitro induction culture; Exudate