

文章编号:1001-4829(2006)05-0940-03

苦瓜愈伤组织再生植株研究

宣朴^{1,2,3}, 陈新⁴, 岳春芳³, 陈放^{1*}

(1. 四川大学生命科学学院, 四川成都 610064; 2. 四川省农科院农业信息与农村经济研究所, 四川成都 610066; 3. 四川省农科院生物技术核技术研究所, 四川成都 610066; 4. 成都中医药大学, 四川成都 610075)

摘要:将3种苦瓜的上胚轴、下胚轴、子叶、真叶和茎尖等外植体接种于脱分化诱导培养基上,均可诱导形成愈伤组织。将结构致密,乳白色或淡绿色,表面呈球状或瘤状突起的愈伤组织转移到再分化培养基上,45 d后,部分愈伤组织陆续分化形成胚状体。将胚状体转移到生根培养基上,可形成根系完整的再生植株。

关键词:苦瓜;组织培养;愈伤组织;胚状体;再生植株

中图分类号:S603.6;S642.5 **文献标识码:**A

Study on plant regeneration via callus culture of bittergourd (*Momordica charantia* L.)

XUAN Pu^{1,2,3}, CHEN Xin⁴, YUE Chun-fang³, CHEN Fang^{1*}

(1. College of Life Science, Sichuan University, Sichuan Chengdu 610064, China; 2. Institute of Agricultural Information & Rural Economy, Sichuan Chengdu 610016, China; 3. Institute of Biological & Nuclear Technology, Sichuan Academy of Agricultural Sciences, Sichuan Chengdu 610066, China; 4. University of Traditional Chinese Medicine In Chengdu, Sichuan Chengdu 610075, China)

Abstract:The epicotyls, hypocotyls, cotyledons, euphyllus and sapexes as explants, cut off from the sterile seedlings of Lanshan Dabai bittergourd, Qinglu Youshen bittergourd and Dading CuiLu No.1 bittergourd, were inoculated on different dedifferentiation media and incubated at temperature of 25-26 °C under weak artificial light for 11 hours each day. Usually, all types of the explants another would produce calli after 4 days. When growing up to 0.5-1 cm in diameter, those calli with tiny strumaes on their surface were transferred to the redifferentiation media and kept at temperature of 26-28 °C under artificial light of 1500 lx for 11 hours each day. 45 days after, there were several tiny green spots appeared on the surface of some calli, which formed some somatic embryos and regenerated the entire green plantlets with their own root systems on strengthening and rooting media.

Key words:bittergourd(*Momordica charantia* L.); tissue culture; callus; somatic embryo; regenerated plantlet

苦瓜(*Momordica charantia* L.)为葫芦科(*Cucurbitaceae*)苦瓜属植物,已有数百年食用和药用历史,全国各地均有栽培。苦瓜既是我国人民喜爱的蔬菜,也是一种传统的药用植物^[1-4]。目前,国内外有关苦瓜组织培养的研究为数不多,尚无通过愈伤组织再生成苗的先例^[5-9]。为此,我们对苦瓜不同部位的外植体采用不同种类的激素及浓度配比进行了离体培养研究,首次通过诱导外植体愈伤组织分化胚状体途径,成功地获得了苦瓜再生植株。

1 材料与方

1.1 材料

本试验在四川省农科院生物技术核技术研究所

植物组培室内进行。供试材料为:蓝山大白苦瓜、泰国青绿油身苦瓜(购自四川省农科院种子市场),以及翠绿一号大顶苦瓜(由广东省农科院蔬菜所赠送)。

1.2 培养基

无菌苗培养基为1/2MS+蔗糖3%+琼脂0.5%,pH 5.8。脱分化培养基以MS为基本培养基,设以下处理:MS+6-BA 1 mg/L+肌醇100 mg/L(代号S₁);MS+6-BA 2 mg/L+肌醇100 mg/L(代号S₂);MS+6-BA 3 mg/L+肌醇100 mg/L(代号S₃);MS+6-BA 4 mg/L+肌醇100 mg/L(代号S₄);MS+6-BA 5 mg/L+肌醇100 mg/L(代号S₅);MS+6-BA 6 mg/L+肌醇100 mg/L(代号S₆);MS+6-BA 4 mg/L+KT 2 mg/L+肌醇100 mg/L(代号S₇);MS+ZT 4 mg/L+LH 50 mg/L(代号S₈);MS+ZT 4 mg/L+KT 0.5 mg/L+LH 50 mg/L(代号S₉);MS+ZT 4 mg/L+IAA 0.1 mg/L+

收稿日期:2005-10-12

作者简介:宣朴(1964-),男,博士生,研究员,主要从事作物遗传育种研究,*为通讯作者。

表1 不同外植体对愈伤组织诱导的反应

Table 1 Responses of different explants to callus induction

脱分化培养基 DDM	材料	上胚轴 Epicotyl			下胚轴 Hypocotyls			子叶 Cotyledon			真叶 Euphyllum			茎尖 Apex		
		1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
S ₄	外植体数 Explant pieces	58	106	84	67	186	90	42	221	145	24	100	38	13	26	6
	愈伤块数 Callus number	55	96	78	59	161	72	40	202	136	22	87	31	12	23	5
	出愈率(%) Ratio	94.8	90.6	92.8	88.1	86.6	80.0	95.2	91.4	93.8	91.7	87.0	81.5	92.3	88.5	83.3

注: 1: 蓝山大白苦瓜, 2: 泰国青绿油身苦瓜, 3: 翠绿一号大顶苦瓜; DDM.: Dedifferentiation medium; 1: Lanshan Dabai bittergourd; 2: Qinglu Youshen bittergourd; 3: Cuilu No. 1 Dading bittergourd.

LH 50 mg/L(代号 S₁₀); 所有处理均添加蔗糖 3%、琼脂 0.6% 和肌醇 100 mg/L, pH 5.8。再分化培养基以 MS 为基本培养基, 并设以下处理: MS + 6-BA 4 mg/L + KT 2 mg/L(代号 B₁); MS(1.5 倍铁盐) + 6-BA 4 mg/L + KT 2 mg/L(代号 B₂); MS + ZT 4 mg/L + KT 0.5 mg/L(代号 B₃); MS + 6-BA 4 mg/L + ZT 4 mg/L(代号 B₄); 所有处理均添加蔗糖 3%、琼脂 0.6% 和肌醇 100 mg/L, pH 5.8。生根壮苗培养基同无菌苗培养基。

1.3 方法

1.3.1 无菌苗的获得 剥去种子坚硬的种皮, 用无菌水冲洗 3 次后浸泡 5 min; 转入 70% 乙醇溶液浸泡 1 min 后, 用无菌水漂洗 3 次; 加入 0.01% HgCl₂ 溶液并滴加少许吐温-80 浸泡 30 min, 中途充分搅拌 3 次, 用无菌水冲洗 5~6 次; 将消毒好的种子用滤纸吸去多余的水分后, 接种于无菌苗培养基上, 置于 25~26℃、800 lx 条件下培养, 萌发获得无菌苗。

1.3.2 脱分化培养 将苗龄 4~5 d、带 2 片真叶的无菌苗的上、下胚轴、子叶、真叶及茎尖切割成 0.5 cm 左右的小段作为外植体, 接种到脱分化培养基上以诱导产生愈伤组织。培养温度 25~26℃, 800 lx, 光周期 11 h/d。

1.3.3 再分化培养 将直径 0.5~1.0 cm 的愈伤组织切割分离并转移到再分化培养基上以诱导产生

胚状体。培养温度 26~28℃, 1500 lx, 光周期 11 h/d。

1.3.4 生根壮苗培养 将从基部切割分离胚状体, 转移到生根壮苗培养基以形成根系发育良好的完整的再生植株。培养温度 26~28℃, 1500 lx, 光周期 11 h/d。

2 结果与分析

2.1 外植体对脱分化诱导愈伤组织的影响

外植体在接种 3~4 d 后, 在切口处开始膨大, 并开始陆续形成愈伤组织, 并且生长速度较快, 20 d 对外植体脱分化诱导愈伤组织的情况进行统计。观察表明, 所有外植体在不同的脱分化培养基中均容易形成愈伤组织。在培养基相同的前提下, 同一外植体, 品种间愈伤组织的诱导率无明显差异; 不同外植体愈伤组织的诱导率有所不同。将 4 d 苗龄不同苦瓜品种的各种外植体接种在 S₄ 培养基 (MS + 6-BA 4 mg/L + 肌醇 100 mg/L) 上, 结果(表 1) 表明, 3 种品种不同外植体的愈伤组织诱导率总体趋势为: 子叶 > 上胚轴 > 茎尖 > 真叶 > 下胚轴。愈伤组织通常主要有 4 种类型: 第 1 种为乳白色, 表面呈球状或瘤状突起, 质地紧密; 第 2 种为淡黄色, 表面较平滑、质地较硬; 第 3 种绿白色, 表面呈瘤状或球状突起, 质地紧密; 第 4 种为绿色, 表面平滑, 质地坚硬; 此外, 还有质地疏松颗粒聚集型的愈伤组织出现。一般第 1 种和第 3 种愈伤组织质量较好, 特别是第 1 种, 茎

表2 不同再分化培养基对苦瓜愈伤组织分化的影响

Table 2 Effects of different redifferentiation medium on regeneration of calli

再分化培养基 RDM	上胚轴 Epicotyl			下胚轴 Hypocotyl			子叶 Cotyledon			真叶 Euphyllum			茎尖 Apex		
	愈伤块数 CN	绿苗数 NCGP	分化率 R(%)	愈伤块数 NC	绿苗数 NCGP	分化率 R(%)	愈伤块数 NC	绿苗数 NCGP	分化率 R(%)	愈伤块数 NC	绿苗数 NCGP	分化率 R(%)	愈伤块数 NC	绿苗数 NCGP	分化率 R(%)
B ₁	40	8	20	45	2	4.4	120	9	8.8	50	2	4.0	60	5	8.3
B ₂	60	3	5.0	45	2	4.4	105	5	4.8	60	2	3.3	70	4	5.7
B ₃	50	1	2.0	45	-	-	100	-	-	80	-	-	60	-	-
B ₄	45	2	4.4	50	-	-	80	-	-	60	-	-	50	-	-

RDM: Dedifferentiation medium; NC: Callus number; NCGP: Number of callus giving green plantlets; R: Ratio.

尖、上胚轴和子叶多形成此类愈伤组织,第2和第4种愈伤组织无法分化出胚状体。

2.2 外源激素对外植体愈伤组织诱导的影响

从愈伤组织诱导率的角度衡量,单独使用6-BA的诱导效果较单独使用ZT、KT或复配6-BA+KT和ZT+KT的好,说明苦瓜外植体对6-BA的诱导作用更为敏感。子叶不同6-BA浓度的诱导培养结果表明,当6-BA浓度 $< 2 \text{ mg/L}$ 或 $> 5 \text{ mg/L}$ 时,各品种子叶的愈伤组织诱导率将明显下降;当6-BA浓度达到 $4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,各品种子叶的愈伤组织诱导率均达到最高值,分别为95.2%(蓝山大白苦瓜),91.4%(泰国青绿油身苦瓜)和93.8%(翠绿一号大顶苦瓜)。这种结果在其它几种外植体上也有相似的反应。因此, S_4 培养基(MS+6-BA 4 mg/L +肌醇 100 mg/L)可视为最适当的苦瓜外植体脱分化培养基。

2.3 愈伤组织的再分化和再生植株的形成

将直径0.5~1.0 cm,表面呈球状或瘤状突起,质地紧密的愈伤组织及时转移到再分化培养基培养约45 d后,部分愈伤组织表面开始出现绿色突起,继而发育形成胚状体。同时有现象表明,极少数未及时转移的愈伤组织在脱分化培养基中能一次性分化形成不定芽。

从表2可见,不同外植体诱导产生的愈伤组织在不同再分化培养基中的绿苗分化率有所不同。总体上看,所有外植体均可再分化形成绿苗,其难易度为:上胚轴 $>$ 茎尖 $>$ 子叶 $>$ 下胚轴 $>$ 真叶。4种再分化培养基中, B_3 和 B_4 仅能诱导上胚轴愈伤组织分化形成胚状体,而 B_1 和 B_2 能诱导所有类型外植体的愈伤组织分化形成胚状体,两者又以铁盐含量正常的 B_1 培养基最佳。因此,可以将 B_1 培养基(MS+6-BA 4 mg/L +KT 2 mg/L)视作诱导效果和适应性最强的再分化培养基。

2.4 生根壮苗培养

及时从基部切割分离胚状体并转移到不含任何外源激素的 $1/2\text{MS}$ 的生根壮苗培养基中以促生根。通常14 d后,部分幼苗基部四周会再生出不定芽。将不定芽切割分离1~2次后,每个芽的基部都会发根2~5条,成为完整的再生植株。

3 结论与讨论

在植物组织培养中,植株再生通常可通过二种主要途径,即不定芽发生和体细胞胚发生实现。从

理论上讲,通过适当的条件和植物激素的配比,两条植株再生途径均可在同一植物中发生^[10]。本实验从诱导愈伤组织分化胚状体途径成功地获得了苦瓜再生植株。

植物组织培养中,细胞激动素与生长素的比值对组织发育方向起确定作用。葫芦科植物内源生长素水平一般较高,如哈密瓜的各种外植体内源IAA的含量通常超过一般植物的数倍,故其愈伤组织不易分化出不定芽成苗^[11-12]。本试验表明,苦瓜各种外植体在不添加任何外源生长素的脱分化培养基中,极易诱导出愈伤组织,即便是已分化形成的再生绿苗;而绿苗分化率相对愈伤组织诱导率要低得多。这可以从一个方面表明,苦瓜各种外植体乃至愈伤组织中可能同样存在内源生长素含量较高的现象。

试验证明,要使苦瓜愈伤组织能再分化形成绿苗,最适当的方法就是在脱分化和再分化培养基中选择恰当的细胞激动素类物质并提高其含量以降低愈伤组织中内源生长素的相对比率,使其有利于朝体细胞胚方向发展。

参考文献:

- [1]江苏中医学院.中药大辞典(上册)[M].上海:上海科技出版社,1986.1201.
- [2]康廷国,翟延君,王树实,等.苦瓜的生药鉴定研究[J].中草药,1998,29(3):196-198,213.
- [3]肖志艳,陈迪华,斯建勇.苦瓜的化学成分研究[J].中草药,2000,31(8):571-573.
- [4]徐国钧,黄泰康,丁志遵,等.中药辞海[M].北京:中国医药科技出版社,1997.608.
- [5]Hoque A, Islam R, Arima S. High frequency plant regeneration from cotyledon-derived callus of *Momordica dioica* (Roxb.) Willd[J]. Phytomorphology, 2000, 50: 3-4, 267-272.
- [6]苟小平,唐琳,赵军,等.苦瓜叶肉原生质体的培养[J].四川大学学报(自然科学版),1997,34(6):857-859.
- [7]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.
- [8]唐琳,陈放,贾勇炯,等.苦瓜的离体繁殖[J].植物生理学通讯,1997,33(2):126-127.
- [9]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(1):144-47.
- [10]詹祥灿.植物体细胞胚状体与器官发生的激素调节[J].植物生理学报,1983,9(3):317-325.
- [11]邓向东,耿玉轩,路子显,等.外植体和培养因子对哈密瓜不定芽诱导的影响[J].园艺学报,1996,23(1):57-61.
- [12]于伟常,沈利爽,文香玉,等.哈密瓜内源激素IAA的测定[A].中国科学院遗传研究所工作年报[C].1990.40-41.

(责任编辑 谢成英)