

文章编号:1673-1689(2007)03-0116-05

苦瓜愈伤组织的诱导及培养条件优化

张丽, 李玉锋, 代娟

(西华大学生物工程学院, 四川 成都 610039)

摘要: 利用不同的激素配比,对苦瓜幼苗的各个器官进行愈伤组织诱导,比较其生长情况。通过实验得出,IAA与6-BA搭配比2,4-D与6-BA搭配对苦瓜愈伤组织的诱导及生长要好。当6-BA质量浓度较高(4 mg/L)时,利于苦瓜愈伤组织的诱导。在优化培养条件时,在MS培养基的基础上添加103.125 mg/L的硝酸铵,100 mg/L的水解酪蛋白,蔗糖质量浓度为30 g/L,激素质量浓度为0.5 mg/L 6-BA+0.2 mg/L 2,4-D时,可使苦瓜愈伤组织快速增殖。

关键词: 苦瓜;愈伤组织;诱导;优化

中图分类号: Q 813.12

文献标识码: A

Study on the Inducing Callus of *Momordica charantia* L and Optimizing the Culture Conditions

ZHANG Li, LI Yu-feng, DAI Juan

(College of Biological Engineering, XiHua University, ChengDu 610039, China)

Abstract: Effect of hormone on the induction callus of *Momordica charantia* L was investigated in this manuscript. When 6-BA combination with IAA, a high induction and growth was observed than that of the case of 6-BA combination with 2,4-D. The induction and growth increase with the increase of 6-BA concentration. Furthermore, a high growth rate of *Momordica charantia* L was detected when 103.125 mg/L ammonium nitrate, 100 mg/L hydrolyzed casein, 30 g/L glucose, 0.5 mg/L 6-BA and 0.2 mg/L 2,4-D was supplement to the medium.

Key words: *Momordica charantia* L; callus; inducing; optimization

苦瓜(*Momordica charantia* L.)隶属于葫芦科(Cucurbitaceae)苦瓜属(*Momordica* L.),具有清热、解毒等功效,提取物具有降血糖、抗生育、抗癌和抗艾滋病等作用^[1-2]。近几年对苦瓜离体培养研究的报道已经不少,已有将苦瓜愈伤组织再生成植株的报道^[3-4]。但苦瓜愈伤组织继代培养的报道还未见。继代培养的目的是为了在短时间内使愈伤组织快速生长,疏松易碎。作者设计不同的影响因

子,考察它们对愈伤组织生长的影响,得出最适生长条件,为苦瓜愈伤组织获得代谢目标产物和悬浮培养提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验材料为苦瓜品种“金苦1号”,市售。

收稿日期:2006-08-31.

作者简介:张丽(1981-),女,四川成都人,食品生物技术硕士研究生. E-mail:qing4cao@sina.com

通讯作者:李玉锋(1965-),男,四川成都人,副教授,理学博士,硕导. E-mail:yf_li10@yahoo.com.cn.

1.2 培养基和培养条件

以 MS 培养基为基本培养基, 添加 3 g/dL 蔗糖, 0.8 g/dL 琼脂, pH 5.8, 在此基础上添加不同的激素作为诱导愈伤组织培养基(见表 1)。优化培养基是在 MS 培养基基础上添加较高含量的无机氮源(硝酸铵), 丰富的有机附加物(水解酪蛋白), 不同质量浓度的蔗糖和不同质量浓度的激素配比。100 mL 三角瓶装 30 mL 培养基。培养条件: 温度(25 ± 2) °C, 无菌苗生长时, 每天光照 12 h, 光照强度为 2 000 Lux; 诱导愈伤组织和优化培养时, 采用弱光培养或暗培养。

1.3 实验方法

1.3.1 技术路线 种子→无菌苗的获得→外植体的采取→诱导条件探索→愈伤组织的形成→优化条件探索→继代培养

1.3.2 无菌苗的获得 将种子破壳, 25 °C 水中浸泡 24 h。去壳后用 5 g/dL 的次氯酸钠浸泡 15~20 min, 在超净台上用无菌水冲洗 5 次。接种到不添加激素的培养基中, 每瓶接种 4~5 颗种子, 使种子萌芽形成无菌苗。

1.3.3 外植体的采取 将播种 8-12 d 的苦瓜无菌苗的上胚轴、下胚轴切成 0.5 cm 长的小段, 子叶切成 0.5 cm × 1.0 cm 的小块, 叶子切成 0.5 cm × 0.5 cm 的小片作为外植体, 接种到愈伤组织诱导培养基上, 每瓶接种 5~7 个, 每种配比接种每种外植体 20~30 个, 以形成愈伤组织。

1.4 优化培养条件

将生长出来的愈伤组织在超净台上用解剖刀或剪刀等工具切成 0.5 cm × 0.5 cm × 0.5 cm 大小的小块, 接种到已设计好的优化培养基中, 每瓶接种 5~7 个, 每种培养基接种 3 瓶。接种前先称量装有培养基的三角瓶的质量, 接种完后再称其质量, 后者减去前者就为初始接种量(ω_1), 培养一段时间后, 称其总重, 取出愈伤组织后, 再称量瓶的质量, 前者减去后者就为培养物最终质量(ω_2)。

2 结果与分析

2.1 愈伤组织的诱导与分析

培养 2 d 后, 外植体的切口处开始膨大, 10 d 后开始出现小米粒状的愈伤组织。上胚轴、下胚轴通常是只有一端的愈伤组织生长茂盛; 子叶的四周均出现愈伤组织; 叶子的外延没有出现愈伤组织, 仅在切口处有。培养 23~26 d 的数据见表 1。所有的激素配比都能将所有的的外植体诱导愈伤组织, 只是形成的时间不同, 形态也有所差别。其中叶子形成最晚, 生长也最慢, 在观察统计期间, 其愈伤组

织生长量很少。诱导出来的苦瓜愈伤组织从形态上可分为两种类型: A, 绿色的愈伤组织, 光泽, 坚硬, 用解剖刀才能剥落, 表面呈瘤状或具有球状的突起; B, 黄绿色的愈伤组织, 较坚硬, 部分表面有球状突起; C, 黄色的愈伤组织, 质地较为疏松, 易剥落、破碎。本实验中得到的多为黄绿色愈伤组织。

表 1 激素对苦瓜幼苗各器官形成愈伤组织的诱导效果
Tab. 1 The effects of phytohormone on the induction of callus vegetative

组别	激素质量浓度/(mg/L)			生长度				总计
	6-BA	2,4-D	IAA	下胚轴	子叶	上胚轴	叶	
I	1.0	0.5		+	++	+	+	5
II	2.0	0.5		++	+	++	+	6
III	4.0	0.5		++	++	+++	+	8
IV	1.0	2.0		++	+	++	+	6
V	2.0	2.0		+	+	++	+	5
VI	4.0	2.0		++	++	++	+	7
VII	1.0		1.0	++	++	+++	+	8
VIII	2.0		1.0	+++	++	++	+	8
IX	4.0		1.0	++	++	+++	+	8
X	1.0		4.0	++	+++	++	++	9
XI	2.0		4.0	++	++	++	+	7
XII	4.0		4.0	++	+++	++	++	9
总计				23	23	26	14	86

+ : 愈伤组织生长度为 0.5 cm 以下, ++ : 愈伤组织生长度为 0.5~1.0 cm, +++ : 愈伤组织生长度为 1.0 cm 以上。总计: 一个 '+' 为一个单位。

总的看来, IAA 与 6-BA 搭配比 2,4-D 与 6-BA 搭配对苦瓜愈伤组织的诱导及生长要快。当 6-BA 质量浓度为 4 mg/L 时, 对愈伤组织的诱导有利。其中外植体也有部分影响。下胚轴、子叶、上胚轴在诱导愈伤组织上没有多大差异, 只有叶子愈伤组织诱导和生长较慢。

2.2 继代培养条件的优化与分析

以 MS 培养基 + 1.0 mg/L 6-BA + 0.5 mg/L 2,4-D + 30 g/L 蔗糖为基本培养基, 用添加不同物质和改变成分的质量浓度来作对比。挑选生长均匀、颜色一致的愈伤组织接种到培养基上, 经过两周的培养后, 愈伤组织在贴近培养基的地方又长出新的愈伤组织, 其形态和诱导出来的愈伤组织一样。通过单因素实验, 确定设计的因素是否对苦瓜愈伤组织的生长具有显著影响。

为了确定影响愈伤组织增长速度的最适条件,在每个单因子实验中,测定生长速度,绝对生长速率(R_a)的公式为: $R_a = (\omega_2 - \omega_1) / (t \cdot v)$ 。 ω_1 为起始接种量(g), ω_2 为最终培养物的质量(g), v 为培养基的体积(L), t 为培养时间(d)。计算相对生长速率(R_r)的公式为: $R_r = t^{-1} \ln(\omega_2 / \omega_1)$ [4]。

2.2.1 硝酸铵对愈伤组织生长的影响 硝酸铵添加量为MS培养基中硝酸铵量的0,1/16,1/8,1/4,1/2,实验中每个水平重复3次。分别计算相对生长速率,结果见表2。

表2 硝酸铵质量浓度对苦瓜愈伤组织生长的影响
Tab.2 Effects of ammonium nitrate on callus growth

硝酸铵质量浓度/(mg/L)	R_{r1}	R_{r2}	R_{r3}	R_r
0 (0)	0.0774	0.0902	0.0844	0.0840
103.125 (1/16)	0.1231	0.1089	0.1178	0.1166
206.25 (1/8)	0.1059	0.0978	0.1064	0.1034
412.5 (1/4)	0.0922	0.1003	0.0915	0.0947
825 (1/2)	0.1024	0.0907	0.1043	0.0991

由图1可以看出,添加了硝酸铵后愈伤组织的生长率比没有添加上的生长率要高些,随着添加量的增加,硝酸铵对生长速率的影响逐渐平缓。在高浓度硝酸铵的培养基中,愈伤组织经过一段时间的培养,逐渐变为绿色。经过方差分析,硝酸铵添加量按水平改变时,对愈伤组织生长速率的影响在误差范围以外,因此,硝酸铵对苦瓜愈伤组织生长有显著影响。

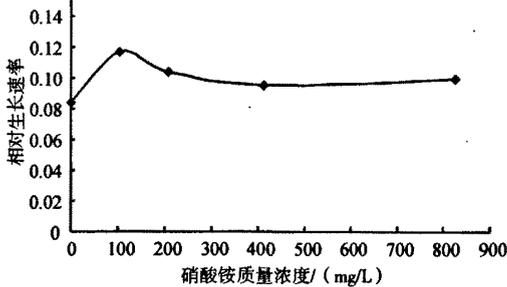


图1 硝酸铵质量浓度对苦瓜愈伤组织生长的影响

Fig.1 Effects of ammonium nitrate on callus growth

2.2.2 水解酪蛋白质量浓度对苦瓜愈伤组织生长的影响 考察了水解酪蛋白不同质量浓度对苦瓜愈伤组织生长的影响。水解酪蛋白质量浓度分别

为100,300,500,700,900 mg/L,每个水平重复3次,分别计算相对生长速率,结果见表3。

由图2可以看出,水解酪蛋白质量浓度较低时,对苦瓜愈伤组织的生长有利,质量浓度逐渐增高后,生长速率降低,且逐渐平缓。愈伤组织在高质量浓度的水解酪蛋白的培养基中,培养一段时间后,表面开始变黄,生长缓慢。经过方差分析,水解酪蛋白添加量水平改变时,对愈伤组织生长速率的影响在误差范围以外,因此,水解酪蛋白对苦瓜愈伤组织生长有显著影响。

表3 水解酪蛋白添加量对苦瓜愈伤组织生长的影响
Tab.3 Effects of hydrolyzed casein on callus growth

水解酪蛋白质量浓度/(mg/L)	R_{r1}	R_{r2}	R_{r3}	R_r
100	0.0931	0.1044	0.0876	0.0950
300	0.1253	0.1145	0.1438	0.1279
500	0.0705	0.0926	0.0821	0.0817
700	0.0678	0.0705	0.0525	0.0636
900	0.0601	0.0784	0.0542	0.0642

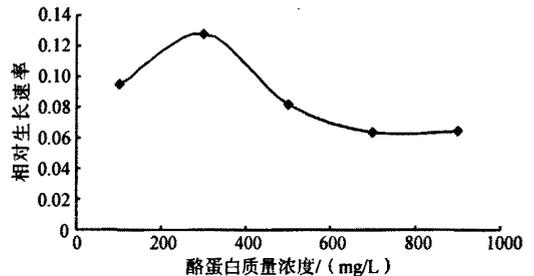


图2 水解酪蛋白质量浓度对苦瓜愈伤组织生长速率的影响

Fig.2 Effects of hydrolyzed casein on callus growth

2.2.3 蔗糖质量浓度对愈伤组织生长的影响 考察不同的碳源质量浓度对愈伤组织生长的影响。蔗糖的质量浓度分别为10,20,30,40,50 g/L,每个水平重复3次,分别计算相对生长速率,见表4。

表4 蔗糖对愈伤组织生长的影响

Tab.4 Effects of sugar on callus growth

蔗糖质量浓度/(g/L)	R_{r1}	R_{r2}	R_{r3}	R_r
10	0.0407	0.0380	0.0368	0.0388
20	0.0934	0.1043	0.0894	0.0990
30	0.0774	0.0902	0.844	0.0840
40	0.0840	0.0804	0.0910	0.0851
50	0.0837	0.0934	0.0792	0.0854

由图3可以看出,当蔗糖质量浓度大于10 g/L

时, 苦瓜愈伤组织的相对生长速率趋于一致。蔗糖质量浓度在 50 g/L 时, 长出的愈伤组织呈绿色, 且颜色较深。经过方差分析, 蔗糖质量浓度水平改变时, 对愈伤组织生长速率的影响在误差范围以外, 因此, 蔗糖浓度对苦瓜愈伤组织生长有显著影响。

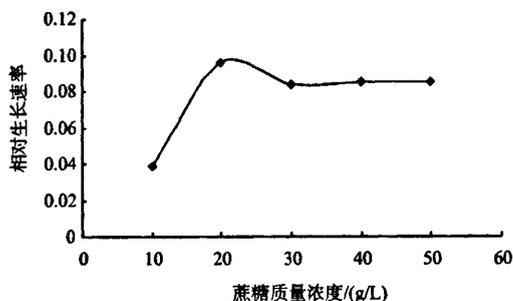


图 3 蔗糖质量浓度对愈伤组织生长的影响

Fig. 3 Effects of sugar on callus growth

2.2.4 激素质量浓度对愈伤组织生长的影响 考察不同激素质量浓度对比对愈伤组织生长的影响。激素的质量浓度 6-BA/2, 4-D 分别为: 0.2/0.1, 0.5/0.2, 1.0/0.5, 2.0/1.0, 5.0/2.0 mg/L, 每个水平重复 3 次, 分别计算相对生长速率, 见表 5。

表 5 激素对比对愈伤组织生长的影响

Tab. 5 Effects of hormones concentrations on callus growth

激素质量浓度 6-BA/2,4-D (mg/L)	R_{11}	R_{12}	R_{13}	R_1
0.2/0.1	0.1392	0.1439	0.1356	0.1396
0.5/0.2	0.0838	0.0852	0.0755	0.0815
1.0/0.5	0.0774	0.0902	0.0844	0.0840
2.0/1.0	0.0805	0.0896	0.0842	0.0848
5.0/2.0	0.0608	0.0851	0.0721	0.0727

由图 4 可以看出, 由 6-BA 和 2,4-D 组合的激素,

在 6-BA 质量浓度为 0.2 mg/L, 2,4-D 质量浓度为 0.1 mg/L 时, 苦瓜愈伤组织的生长速率比在其他组合情况下高很多, 当激素质量浓度逐渐增大时, 愈伤组织的相对生长速率逐渐平缓。愈伤组织在较高质量浓度的激素配比中生长缓慢, 且颜色偏深黄。经方差分析, 激素质量浓度改变时, 对愈伤组织生长速率的影响在误差范围以外, 因此, 激素质量浓度对苦瓜愈伤组织生长有显著影响。

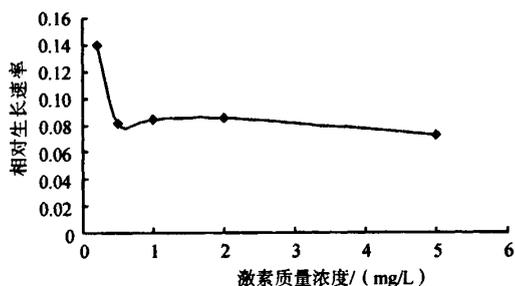


图 4 激素质量浓度对愈伤组织生长的影响

Fig. 4 Effects of concentrations of on callus growth

2.2.5 正交实验设计 根据单因素实验确定了正交实验的因素及水平(见表 6)。选用正交实验表 $L_9(3^4)$ 表。每个实验组合重复实验 3 次, 分别计算相对生长速率, 见表 7。

表 6 供试因素及水平

Tab. 6 Experimental factors and levels

因素 水平	A 硝酸铵 质量浓度/ (mg/L)	B 水解酪 蛋白质量 浓度/ (mg/L)	C 蔗糖 质量浓度/ (g/L)	D 激素 质量浓度 6-BA/2.4D/ (mg/L)
1	0	100	20	0.2/0.1
2	103.125(1/16)	300	30	0.35/0.15
3	206.25(1/8)	500	40	0.5/0.2

表 7 正交设计实验结果

Tab. 7 Orthogonal design and experimental results

实验号	因素				结果		
	A	B	C	D			
1	1	1	1	1	0.0902	0.0973	0.0879
2	1	2	2	2	0.0933	0.1187	0.1003
3	1	3	3	3	0.1200	0.0935	0.1009
4	2	1	2	3	0.1612	0.1397	0.1452
5	2	2	3	1	0.0977	0.1188	0.1330
6	2	3	1	2	0.0843	0.0896	0.1042
7	3	1	3	2	0.0794	0.0931	0.0951
8	3	2	1	3	0.0643	0.0461	0.0639
9	3	3	2	1	0.0918	0.0880	0.0689
K_1	0.9021	0.9891	0.7278	0.8736	$P=2.6644^2/27=0.2633$		
K_2	1.0737	0.8361	1.0071	0.8580	$W=0.2807 W_1=0.2782$		
K_3	0.6906	0.8412	0.9315	0.9348	$S_T=W-P=0.0174$		
Q	0.2715	0.2650	0.2680	0.2637	$S_{T1}=W_1-P=0.0149$		
S	0.0081	0.0017	0.0047	0.0004	$S_{e2}=S_T-S_{T1}=0.0025$		

表8 方差分析表

Tab.8 The analysis of variance

方差来源	平方和	自由度	均方	F	临界值
A	0.0081	2	0.00405	29.16***	$F_{0.01}=6.01$
B	0.0017	2	0.00085	6.12***	$F_{0.05}=3.55$
C	0.0047	2	0.00235	16.92***	$F_{0.1}=2.62$
D	0.0004	2	0.0002	1.44	
误差	0.0025	18	0.0001389		
总和	0.0174	26			

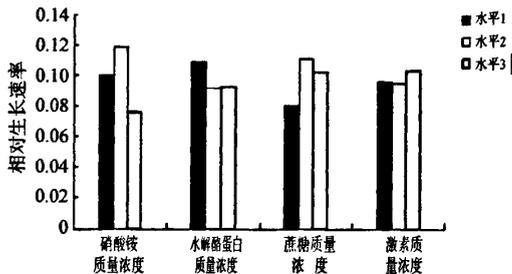


图5 各因素水平对苦瓜愈伤组织相对生长速率的影响

Fig.5 Effects of different factors on callus growth

由表7,表8和图5进行直观分析和方差分析,结果表明:影响苦瓜愈伤组织生长速率的因素的主次顺序为A(硝酸铵质量浓度)>C(蔗糖质量浓度)>B(水解酪蛋白质量浓度)>D(激素质量浓度),其中因素A、B、C的影响非常显著,因素D的影响不显著。确定的最优水平搭配为 $A_2B_1C_2D_3$,即在MS培养基的基础上,再添加103.125 mg/L的硝酸铵,100 mg/L的水解酪蛋白,30 g/L的蔗糖,0.5 mg/L的6-BA和0.2 mg/L的2,4-D。

参考文献(References):

- [1] 向亚林,凌冰,张茂新. 苦瓜化学成分和生物活性的研究进展[J]. 天然产物研究与开发,2005,17(2):242-246.
XIANG Ya-lin, LING Bing, ZHANG Mao-xin. Research advances in the chemical and biological studies on *Momordica charantia* L. [J]. *Natural Product Research and Development*, 2005, 17(2): 242-246. (in Chinese)
- [2] 王晨明. 植物多糖的药理作用[J]. 中国药业,2002,11(11):73-74.
WANG Chen-ming. Pharmacological effect of vegetal polysaccharide[J]. *China Pharmaceuticals*, 2002, 11(11): 73-74. (in Chinese)
- [3] 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.
XUAN Pu, YUE Chun-fang, LI Yue-jian, et al. Plantlet regeneration from calli of bitter gourd (*Momordica charantia*) [J]. *Plant Physiology Communications*, 2003, 39(6): 633.
- [4] 朱至清. 植物细胞工程[M]. 北京:化学工业出版社,2003:174.

(责任编辑:李春丽)