

胡雪丹, 张曼, 侯茜, 等. 不同影响因子诱导葫芦花药愈伤组织[J]. 江苏农业学报, 2016, 32(5): 1155-1161.  
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2016.05.032

## 不同影响因子诱导葫芦花药愈伤组织

胡雪丹<sup>1,2</sup>, 张曼<sup>1</sup>, 侯茜<sup>1</sup>, 徐锦华<sup>1</sup>, 刘广<sup>1</sup>, 姚协丰<sup>1</sup>, 李莘芳<sup>1</sup>, 任润生<sup>1</sup>,  
陈学好<sup>2</sup>, 羊杏平<sup>1</sup>

(1. 江苏省农业科学院蔬菜研究所/江苏省高效园艺作物遗传改良重点实验室, 江苏 南京 210014; 2. 扬州大学园艺与植物保护学院, 江苏 扬州 225009)

**摘要:** 为研究葫芦花药愈伤组织诱导的影响因素, 筛选出最适宜诱导葫芦花药愈伤组织的培养条件, 以3个葫芦品种为试验材料, 观察不同低温预处理、热激处理以及激素和活性炭处理对花药愈伤组织诱导率及生长的影响。结果表明, 不同基因型愈伤组织诱导率差异显著; 最佳预处理方法是4℃低温预处理2d, 33℃高温热激暗培养1d; MS培养基添加2,4-D和6-BA能诱导出愈伤组织, 愈伤组织按外观和质地分为6种类型, 随着激素浓度增加愈伤组织诱导率递增, 添加1.5 mg/L 2,4-D+2.0 mg/L 6-BA和2.0 mg/L 2,4-D+2.0 mg/L 6-BA的培养基最有利于诱导愈伤组织; MS基本培养基不能诱导愈伤组织, 活性炭抑制花药诱导愈伤组织。说明, 在添加了适量浓度的2,4-D和6-BA的MS培养基上能成功诱导出葫芦花药愈伤组织。

**关键词:** 葫芦; 花药培养; 愈伤组织

**中图分类号:** S642.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2016)05-1155-07

## Induction of calli in anther culture of gourd influenced by temperature, hormone and activated carbon

HU Xue-dan<sup>1,2</sup>, ZHANG Man<sup>1</sup>, HOU Qian<sup>1</sup>, XU Jin-hua<sup>1</sup>, LIU Guang<sup>1</sup>, YAO Xie-feng<sup>1</sup>, LI Ping-fang<sup>1</sup>,  
REN Run-sheng<sup>1</sup>, CHEN Xue-hao<sup>2</sup>, YANG Xing-ping<sup>1</sup>

(1. Institute of Vegetable, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences/Jiangsu Key Laboratory for Horticultural Crop Genetic Improvement, Nanjing 210014, China; 2. College of Horticulture and Plant Protection, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China)

**Abstract:** The factors affecting the induction of anther callus were studied on three gourd varieties. The induction rate of calli varied in different gourd genotypes. The best pretreatment was set at 4℃ for two days and dark culture at 33℃ for one day. MS medium added with 2,4-D and 6-BA could induce calli which were divided into 6 types according to the appearance and texture. With the increase of hormone concentrations, the induction rate of calli increased. MS basic medium added with 1.5 mg/L 2,4-D+2.0 mg/L 6-BA and 2.0 mg/L 2,4-D+2.0 mg/L 6-BA were favorable for callus induction. Activated carbon could inhibit the induction of callus.

**Key words:** gourd; anther culture; callus

收稿日期: 2016-02-01

基金项目: 国家科技支撑计划项目(2012BAD02B03-14); 国家西甜瓜产业技术体系岗位科学家项目(CARS-NO. 26); 江苏省农业科技自主创新基金项目[CX(14)2004]

作者简介: 胡雪丹(1990-), 女, 江苏泰州人, 硕士研究生, 研究方向为葫芦花药培养及游离小孢子培养。(E-mail) 276518157@qq.com

通讯作者: 羊杏平, (E-mail) xingping@jaas.ac.cn

葫芦 [*Lagenaria siceraria* (Molina) Standl.] 为葫芦科 (Cucurbitaceae) 葫芦属, 一年生攀援草本植物, 又名瓠瓜、瓠子、扁蒲、蒲瓜、夜开花等<sup>[1-2]</sup>。葫芦是适宜嫁接的优良砧木。葫芦科植物的常规遗传育种

方法存在育种周期长、难度大以及遗传性状不稳定等问题。单倍体育种技术为缩短育种年限、提高育种效率提供了可能,但在葫芦科蔬菜作物中,自发产生单倍体的频率极低<sup>[3-4]</sup>。花药培养是获得单倍体及纯合体的有效途径。近年来,花药离体培养的研究进展很快,目前已经有多种植物通过花药培养获得了单倍体植株,其中以十字花科、茄科和禾本科居多<sup>[5-6]</sup>。在葫芦科蔬菜中,从20世纪80年代初,科研工作者相继开展了西瓜、甜瓜、丝瓜、黄瓜等花药培养的研究,瓜类蔬菜作物通过离体雄核发育途径生产单倍体难度较大,只有西瓜的花药培养较为成功<sup>[7]</sup>。薛光荣等<sup>[8-9]</sup>通过西瓜花药培养获得了单倍体植株,但愈伤诱导率仅有0.5%,但同时发现愈伤组织易褐变且诱导率不高;魏瑛<sup>[10]</sup>在4℃和10℃的低温条件下对西瓜花药进行预处理,降低了花药壁愈伤组织的形成,提高了花药愈伤组织的诱导率;陶正南<sup>[11]</sup>对甜瓜进行花药培养,采用单核中后期的花蕾,在添加了KT(激动素)、6-BA(6-苄氨基腺嘌呤)和NAA(萘乙酸)的MS培养基或N6培养基上成功获得了完整再生植株。Kumar等<sup>[12]</sup>2003年成功获得了黄瓜单倍体植株,但诱导频率仍然很低,难以用于育种实践。花药培养通过花药诱导愈伤组织,进一步分化成再生植株,但葫芦花药培养研究未见报道。本研究通过探索葫芦花药发育途径和培养过程中不同因子对葫芦花药愈伤组织发生频率的影响,以确定最适宜葫芦花药培养的条件,为建立葫芦花药离体再生体系进而培育葫芦单倍体植株奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 试验材料

供试葫芦品种为超丰F1、京欣砧1号、横溪砧木1号,由江苏省农业科学院蔬菜研究所瓜类研究室提供。挑选饱满均匀的葫芦砧木种子置于55℃温汤浸种8h,清洗干净后用纱布包裹,于28℃催芽4~5d,露白后播于消毒的营养基质中,至三叶一心时移栽到江苏省农业科学院蔬菜研究所试验大棚,采用常规的田间管理。

### 1.2 预处理方法的筛选

1.2.1 低温预处理 在各品种葫芦植株进入盛花期时,采集小孢子发育至单核期的花蕾(花蕾直径大小在6.3~6.7mm),用湿纱布包裹,放入塑料袋

中,进行4℃低温预处理,设置4个处理,处理时间分别为0d、1d、2d、3d。处理结束后,用70%酒精先将花蕾浸泡40s,无菌水清洗3遍,再用10%(质量体积比)次氯酸钠溶液表面消毒5min,最后在无菌条件下用无菌水冲洗3遍,然后剥取花药接种于MS培养基上。每个处理接种60瓶,每瓶接种6颗花药。

1.2.2 热激处理 在葫芦花药4℃低温预处理不同天数后,每个处理的60瓶花药再分为4组,每组15瓶,3组分别置于30℃、33℃、35℃恒温箱暗培养1d后,再转移至组培室进行培养,培养条件为温度25℃,光/暗周期16h/8h,光照度3000lx。同时设置未经处理的对照组。培养30d、60d后统计花药的成活率。低温预处理时间结合热激处理共16个组合(表1)。

表1 低温预处理与热激处理的16种组合

Table 1 Sixteen combinations of low temperature pretreatments and heat shock treatments

4℃低温预处理 时间(d)	热激处理温度(℃)			
	25	30	33	35
0	T1	T5	T9	T13
1	T2	T6	T10	T14
2	T3	T7	T11	T15
3	T4	T8	T12	T16

### 1.3 培养方法的筛选

1.3.1 外源激素 诱导培养基成分为MS+激素+30g/L蔗糖+8g/L琼脂,添加不同浓度的2,4-D和6-BA 2种外源激素,每个激素浓度分为4个梯度,分别为0.5mol/L、1.0mol/L、1.5mol/L、2.0mol/L,共16种培养基(表2),pH值调至5.8。每个基因型的葫芦植株取样后预处理采用筛选出来的最佳预处理方法,在4℃低温预处理后接种于16种培养基,再经热激处理后置于25℃光培养。每种培养基3个重复,每个重复接种20个花药。定时观察,30d后统计花药愈伤组织诱导率。

1.3.2 活性炭 在表2的16种诱导培养基的基础上,每种培养基添加5%活性炭,采用MS+激素+30g/L蔗糖+8g/L琼脂+5%活性炭组成的培养基。每个基因型的葫芦植株取样后进行预处理,4℃低温预处理后接种于添加了活性炭的16种培养基,再经

热激处理后置于 25 ℃ 光培养。每种培养基 3 个重复,每个重复接种 20 个花药。定时观察,30 d 后统计花药愈伤组织诱导率。

表 2 诱导培养基选用的 16 种激素组合

Table 2 Sixteen combinations of hormones used for inducing gourd callus

6-BA 浓度 (mol/L)	2,4-D 浓度(mol/L)			
	0.5	1.0	1.5	2.0
0.5	H1	H5	H9	H13
1.0	H2	H6	H10	H14
1.5	H3	H7	H11	H15
2.0	H4	H8	H12	H16

#### 1.4 继代培养

将长势好的愈伤组织转移至基本分化培养基:MS+1.5 mg/L 2,4-D+2.0 mg/L 6-BA+30.0 g/L 蔗糖+8 g/L 琼脂,继续培育。

#### 1.5 统计分析

30 d 后统计和分析以上各处理中葫芦花药形成的愈伤组织诱导率并描绘其相应的形态特征。利用 DPS 统计软件进行单因子方差分析。花药存活率=未褐变死亡的花药数/接种花药总数×100%;愈伤组织诱导率=愈伤组织产生数/接种花药总数×100%。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同预处理对花药存活率的影响

取样后,对葫芦花蕾先进行 4 ℃ 低温处理,接种后结合热激处理,再置于 25 ℃ 下光培养,期间对花药进行观察。

在培育 30 d 时,各基因型的花药均呈嫩绿色,体积略有膨大,形态未产生明显改变,未产生愈伤组织。培育至 60 d 时,仍未诱导出愈伤组织,花药的成活率如表 3 所示。在 12 种预处理下,分别对各基因型的花药成活率进行显著性差异分析,3 个基因型的花药在 T11 处理下均存活率最高,存活率分别为超丰 F1 36%,京欣砧 1 号 32%,横溪砧木 1 号 24%,与其他处理差异显著( $P<0.05$ )。在仅 4 ℃ 低温预处理时(T2、T3、T4 处理),花药成活率极低,基本死亡;在仅有热激处理时(T5、T9、T13 处理),随着温度提高,花药的成活率有所提高。当低温预处

理与热激处理结合使用时,花药的成活率有一定的提高,T11 处理均达到最高值。以超丰 F1 为例,在无低温预处理和热激处理时(T1 处理),花药成活率为 0;在仅低温处理时(T2、T3、T4 处理),成活率为 0~4%;在仅热激处理时(T5、T9、T13 处理),成活率为 0~12%;在低温预处理结合热激处理时(T6~T8, T10~T12, T14~T16 处理),成活率为 0~36%。本研究中热激处理效果比低温处理效果显著,但低温处理与热激处理结合更能促进葫芦花药的活力,提高花药的成活率。最佳预处理方法是花蕾经过 4 ℃ 低温预处理 2 d,接种后 33 ℃ 热激暗培养 1 d,再转移至 25 ℃ 光培养。

表 3 不同低温预处理与热激处理组合对葫芦花药成活率的影响

Table 3 Effect of different combinations of low temperature pre-treatments and heat shock treatments on the survival rate of gourd anther

组合	成活率(%)		
	超丰 F1	京欣砧 1 号	横溪砧木 1 号
T1	0f	0d	4e
T2	0f	0d	0f
T3	4e	0d	0f
T4	0f	0d	0f
T5	0f	0d	0f
T6	0f	0d	0f
T7	12d	0d	0f
T8	32ab	16b	0f
T9	8d	16b	4e
T10	24c	0d	4e
T11	36a	32a	24a
T12	28bc	8c	8d
T13	12d	0d	12c
T14	0f	0d	4e
T15	0f	0d	16b
T16	0f	0d	0f

T1、T2、T3、T4、T5、T6、T7、T8、T9、T10、T11、T12、T13、T14、T15、T16 见表 1;同一列数据后不同小写字母表示差异显著( $P<0.05$ )。

### 2.2 不同培养基对葫芦花药愈伤组织诱导的影响

2.2.1 不同培养基对愈伤组织诱导率的影响 由表 4 可以看出,所有激素组合配制的培养基都能诱导出愈伤组织,同一基因型在不同浓度激素处理中花

表4 不同培养基对葫芦花药愈伤组织诱导率的影响

Table 4 Effects of different media on the induction rate of gourd anther calli

培养基	愈伤组织诱导率(%)		
	超丰 F1	京欣砧 1 号	横溪砧木 1 号
H1	20.0l	55.6j	75.0f
H2	63.0i	87.3f	92.3cd
H3	91.1d	85.4g	90.2d
H4	58.0j	86.7f	95.2bc
H5	18.5l	35.9l	70.5g
H6	95.2c	93.3d	100.0a
H7	98.4a	93.3d	95.0bc
H8	88.5f	93.4d	98.3ab
H9	66.1h	100.0a	79.7e
H10	80.6g	82.0i	100.0a
H11	90.0e	98.1b	96.7ab
H12	96.7b	96.7c	100.0a
H13	58.5j	83.3h	80.3e
H14	44.3k	45.9k	70.5g
H15	98.1a	91.7e	96.7ab
H16	96.7b	93.5d	100.0a

H1、H2、H3、H4、H5、H6、H7、H8、H9、H10、H11、H12、H13、H14、H15、H16 见表 2; 同一列数据后不同小写字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ )。

药培养的愈伤组织诱导率存在差异性。超丰 F1 花药培养愈伤组织诱导率较高的激素处理是 H7 和 H15, 诱导率分别为 98.4%、98.1%。在 H12 和 H16 培养基上, 其愈伤组织诱导率均达到 96.7%, 与 H7 和 H15 差异显著 ( $P < 0.05$ )。而 H6 诱导率为 95.2%, 以上 5 种组合的激素培养基产生的愈伤组织诱导率均达到 95% 以上, 较适宜诱导超丰 F1 花药产生愈伤组织。对京欣砧 1 号的花药诱导愈伤组织, H9 诱导率最高, 达 100%, 其次是 H11、H12, 诱导率分别为 98.1%、96.7%。横溪砧木 1 号在 H6、H10、H12 和 H16 培养基上花药的愈伤组织诱导率均为 100%, 在 H8、H15、H11 和 H4 培养基上花药的诱导率均高于 95%, 此基因型较易产生愈伤组织, 所有的培养基中诱导的愈伤组织最少的也有 70.5%。

不同基因型在相同激素浓度处理时, 花药培养愈伤诱导率也有差异。不同的基因型, 其最适激素浓度不同。由表 4 可知, 各基因型的花药在 H12 培养基上的诱导率都在 95% 以上, H12 培养基较利于

诱导葫芦花药愈伤组织。诱导出愈伤组织的概率随着 2,4-D 浓度增加而递增, 在 1.5 mg/L 和 2.0 mg/L 浓度时最高。添加 6-BA 浓度在 2.0 mg/L 时产生愈伤的频率较高, 不同品种间稍有波动。故 1.5 mg/L 2,4-D + 2.0 mg/L 6-BA 和 2.0 mg/L 2,4-D + 2.0 mg/L 6-BA 组合利于诱导愈伤组织。相反, H1、H5 和 H14 激素组合的培养基对各基因型的花药愈伤组织诱导率均比较低。

### 2.2.2 不同培养基对愈伤组织形态特征的影响

花药培养诱导的愈伤组织形态特征描述见表 5。按照外观和质地划分, 主要有 6 类型, I 类: 绿色不透明愈伤组织, 结构致密, 贴近花药表皮生长缓慢, 整体体积较小 (图 1C); II 类: 嫩绿色愈伤组织, 结构疏松, 增殖生长快体积大, 表面相对光滑, 分散性、均一性、通透性均较好 (图 1G); III 类: 黄绿色愈伤组织, 疏松块状, 增殖生长快体积大, 分散性、均一性、通透性均较好 (图 1H); IV 类: 白色不透明的瘤状愈伤组织, 结构致密, 个体有大有小 (图 1B、1E); V 类: 白色半透明愈伤组织, 结构疏松, 在嫩绿色愈伤表层生长 (图 1D); VI 类: 黄色愈伤组织, 由淡黄色透明状转变为黄褐色半透明愈伤, 很快便褐变死亡。

不同激素浓度对产生不同形态的愈伤组织有显著影响。激素浓度较低时, 愈伤组织诱导率低, 愈伤组织膨大缓慢, 体积较小, 易产生绿色致密愈伤组织 (图 1C)。当 2,4-D 浓度低时, 较易产生白色愈伤, 在 H2、H3、H4 培养基中, 京欣砧 1 号出现了白色致密不透明的瘤状愈伤组织 (图 1B、图 1E), 个体有大有小; 横溪砧木 1 号在 H2 培养基上也诱导出白色愈伤组织 (图 1D), 但结构疏松, 白色愈伤组织可以明显看出是从嫩绿色愈伤组织上长出的。随着浓度递增, 培养基上诱导出的多为嫩绿色和黄绿色愈伤组织, 其体积相对较大, 增殖生长迅速, 浓度越高长势越快, 但也有些诱导出黄色愈伤组织褐变死亡的。在培育 40 d 后, 愈伤组织生长缓慢, 将部分转接到基本分化培养基上促进分化, 原先生长缓慢的愈伤组织又开始迅速膨大, 但仍未分化出胚状体, 表明 2,4-D 和 6-BA 2 个激素能不断促进葫芦花药愈伤组织增殖生长。

### 2.3 基因型对葫芦花药愈伤组织诱导的影响

由表 4 和图 1 可以看出, 超丰 F1、京欣砧 1 号和横溪砧木 1 号这 3 个基因型愈伤组织诱导率差异

表5 不同培养基诱导的葫芦花药愈伤组织形态特征

Table 5 Morphological characteristic of gourd anther calli in different culture media

培养基序号	超丰 F1			京欣砧 1 号			横溪砧木 1 号		
	颜色	疏密度	大小	颜色	疏密度	大小	颜色	疏密度	大小
H1	绿色	致密	小	绿色	致密	小→中	黄色	疏松	中
H2	绿色	致密	中	黄绿 白色	致密 致密	中	嫩绿 白色	疏松 疏松	小→大
H3	嫩绿	疏松	小→大	白色	致密	大	黄绿	疏松	小→大
H4	黄绿	疏松	小→大	黄色 白色	疏松 致密	中	黄绿	疏松	小→大
H5	黄绿	致密	小	白色	致密	小	黄色	致密	小
H6	黄绿	疏松	中→大	黄绿	疏松	中	黄绿	致密	大
H7	黄绿	疏松	大	黄绿	疏松	中	黄绿	疏松	大
H8	嫩绿	疏松	大	黄绿	致密	中	黄绿	疏松	大
H9	黄绿	致密	小	黄绿 白色	致密 致密	中	黄绿	致密	大
H10	黄绿	致密	小	黄色	致密	小→中	黄绿	疏松	中
H11	黄绿	疏松	中→大	黄色	致密	中	黄绿	疏松	大
H12	嫩绿	疏松	中	黄绿	致密	中	黄绿	疏松	大
H13	黄绿	致密	大	黄绿	疏松	大	黄色	疏松	大
H14	绿色	致密	小	黄绿	致密	小	黄绿	疏松	大
H15	嫩绿	疏松	小→大	黄色	致密	中→大	嫩绿	疏松	大
H16	黄绿	疏松	中→大	黄色	疏松	中	嫩绿	疏松	大

H1、H2、H3、H4、H5、H6、H7、H8、H9、H10、H11、H12、H13、H14、H15、H16 见表 2; 大小等级: 小: 直径在 0.21~0.50 cm; 中: 直径在 0.51~1.00 cm; 大: 直径在 1.00 cm 以上。

显著 ( $P < 0.05$ )。在各培养基上, 整体来看横溪砧木 1 号诱导愈伤组织的频率最高, 大部分诱导率在 90.0% 以上, 最低为 70.5%, 且大都是嫩绿色和黄绿色愈伤组织; 其次是京欣砧 1 号, 诱导率在 35.9%~100.0%, 但易诱导出白色愈伤组织; 超丰 F1 诱导率在 18.5%~98.4%, 且诱导出的愈伤组织性状不如其他 2 个基因型好。此次试验中 3 个基因型都没有能够分化出胚状体和再生植株, 但筛选出横溪砧木 1 号葫芦花药较利于诱导愈伤组织。

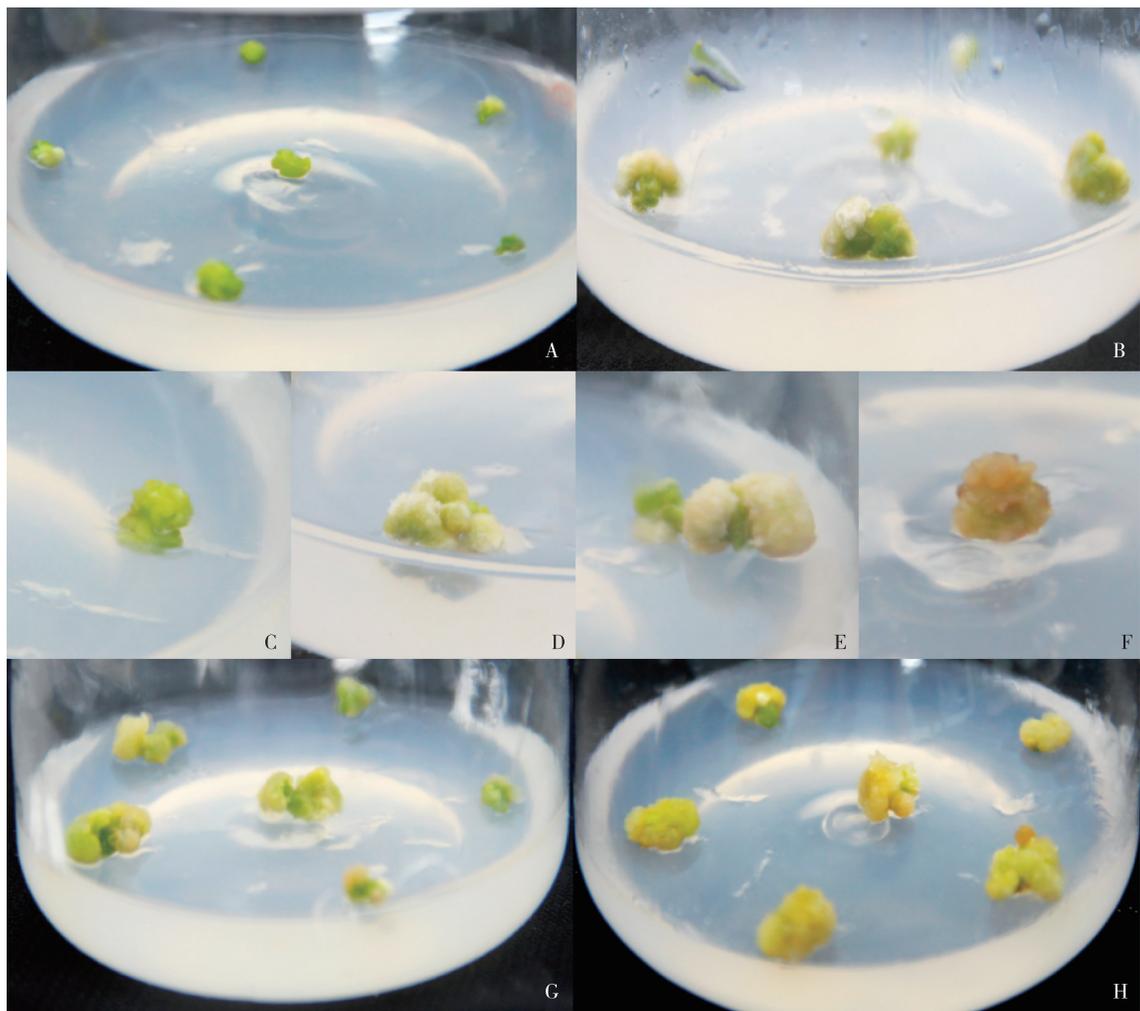
#### 2.4 活性炭对葫芦花药愈伤组织诱导的影响

在花药培养中经常使用活性炭, 活性炭的主要作用是防止花药褐变, 提高花粉愈伤组织的诱导率。但并非所有基因型对活性炭的加入都有反应, 有的基因型的愈伤组织发生能力较强, 加入活性炭后愈伤组织发生率反而下降<sup>[13]</sup>。本试验在不同浓度激素的培养基中添加 5% 的活性炭, 以未添加活性炭的 H1~H16 培养基做对比。在未添加活性炭的培养基中, 花药迅速产生愈伤组织; 而添加活性炭的培养基中, 花药仅体积膨大, 未诱导出愈伤组织, 30 d 后开始褐变死亡。

### 3 讨论

花药培养技术在十字花科、茄科和禾本科等植物上已日趋成熟, 但瓜类花药培养难度较大, 中国在这方面的研究还很少<sup>[14-15]</sup>。本试验借鉴前人的技术并加以改进, 以葫芦花药为材料, 成功诱导出愈伤组织。试验采用 3 种基因型的葫芦花药进行培养, 发现花药培养在很大程度上受到基因型的影响, 不同基因型花药的愈伤组织的诱导率差异显著。横溪砧木 1 号的花药较京欣砧 1 号、超丰 F1 更适宜进行培养, 利于诱导愈伤组织。但在进行各种预处理后, 超丰 F1 的花药成活率最高, 其次是京欣砧 1 号和横溪砧木 1 号, 这与愈伤组织诱导率相反, 说明花药活力与花药诱导愈伤组织的能力并不成正相关, 花药活力高并不一定能够诱导出更多的愈伤组织。

预处理对提高胚状体诱导频率有很好的效果, 经过预处理的花药比较容易培养出花粉愈伤组织或者胚状体并进而得到完整的植株<sup>[16]</sup>。本试验得到的最佳预处理方法是花蕾经过 4 °C 低温预处理 2 d, 接种后 33 °C 高温热激暗培养 1 d, 再转移至 25 °C 光



A: 接种初期; B: 白色愈伤组织; C: 绿色致密愈伤组织; D: 白色疏松愈伤组织; E: 白色致密愈伤组织; F: 黄色愈伤组织; G: 嫩绿色愈伤组织; H: 黄绿色愈伤组织。

图1 不同形态葫芦花药愈伤组织

Fig.1 Different forms of gourd anther calli

培养。仅低温预处理或者热激处理时,花药成活率低,这个现象在苦瓜花药培养中也有报道,4℃冷处理对愈伤组织诱导率的提高不是绝对的<sup>[17-18]</sup>。当低温处理和热激处理结合使用时,花药的成活率显著提高。预处理时采用MS基本培养基,未添加激素(2,4-D和6-BA),花药稍有膨大,但未产生愈伤组织。在添加了激素的培养基中成功诱导出愈伤组织,而在添加了激素和活性炭的培养基中,却出现了花药稍有膨大,未产生愈伤组织的现象。表明仅MS基本培养基不能诱导愈伤组织,添加激素能促进花药诱导愈伤组织,而活性炭抑制花药诱导愈伤组织。这验证了前人的结论,在丝瓜花药培养的研究中明确提出活性炭诱导愈伤组织的效果差,有抑制花药

诱导愈伤组织的作用<sup>[19]</sup>。

外源激素可促进愈伤组织的发生和分化,因此激素是花药培养基中的重要成分,通常认为在愈伤组织培养中脱分化主要使用2,4-D,而6-BA和KT则是启动分化的主要激素<sup>[20]</sup>。在添加了不同浓度的2,4-D和6-BA的MS培养基上,葫芦花药成功诱导出愈伤组织。诱导出愈伤组织的概率随着2,4-D和6-BA浓度增加而递增,得出1.5 mg/L 2,4-D+2.0 mg/L 6-BA和2.0 mg/L 2,4-D+2.0 mg/L 6-BA的组合利于诱导愈伤组织。并且随着激素浓度增加,产生的愈伤组织增殖生长越快,体积越大,多为嫩绿色和黄绿色愈伤组织,结构疏松,表面相对光滑,分散性、均一性、通透性好。在其他瓜类

花药培养技术体系探索过程中,证实适当增加 2,4-D 浓度能提高愈伤组织诱导率,2,4-D 是作用最明显的生长激素,适当提高 6-BA 的浓度可提高直接增殖率和分化率<sup>[21]</sup>。相反,激素浓度越低越不利于花药诱导愈伤组织。后期将长势好的愈伤组织转至基本培养基,发现愈伤组织只进行增殖生长未进行分化,说明仅 2,4-D 和 6-BA 2 种激素只能诱导葫芦花药的愈伤组织生长,若想后续分化出胚状体和再生植株,还需要进一步探索。

#### 参考文献:

- [1] 朱德蔚,王德斌,李锡香. 中国作物及其野生近缘植物-蔬菜作物卷[M]. 北京:中国农业出版社,2008:533-534.
- [2] 阳燕娟,来可可,陈文明,等. 砷用葫芦种质资源耐热性评价[J]. 南方农业学报, 2015,46(6):1047-1052.
- [3] SAVIN F, DECOMBLE V, LECOUVIOUR M, et al. The X-ray detection of haploid embryos arisen in muskmelon *Cucumis melon* L. seeds and resulting from a parthenogenetic development induced by irradiated pollen [J]. *Cucurbit Gene*, Coop, 1988, 11:39-42.
- [4] 荣文娟,朱迎春,孙德玺,等. 葫芦科作物未受精子房和胚珠离体培养研究进展[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(2): 4-7.
- [5] 张晓晴,杨际双,郑志兴. 仙客来花药培养胚状体诱导影响因素的研究[J]. 江苏农业科学, 2009, 37(1):57-58.
- [6] 刘国民. 花药离体培养中若干问题的研究进展[J]. 海南大学学报(自然科学版), 1994, 12(3):253-260.
- [7] 雷春,陈劲枫. 葫芦科蔬菜作物单倍体材料创制的研究进展[J]. 中国蔬菜, 2006(2):33-36.
- [8] 薛光荣,余文炎,费开伟,等. 西瓜花药离体培养获得花粉植株[J]. 植物生理学报, 1983(4):40-42.
- [9] 薛光荣,余文炎,杨振英. 西瓜花粉植株的诱导及其后代初步观察[J]. 遗传, 1988, 10(2):5-8.
- [10] 魏瑛. 低温预处理对西瓜花药愈伤组织诱导的影响[J]. 甘肃农业科技, 1999(9):34-35.
- [11] 陶正南. 甜瓜花药培养诱导成植株[J]. 植物生理学通讯, 1987(5):43-47.
- [12] KUMAR H G A, MURTHY H N, PAEK K Y. Embryogenesis and plant regeneration from anther cultures of *Cucumis sativus* L. [J]. *Scientia Horticulturae*, 2003, 98:213-222.
- [13] 缙艳霞. 西瓜花药离体培养技术研究[D]. 杭州:浙江大学, 2006.
- [14] 陈佳,李焕秀,杨永超,等. 瓜类蔬菜作物花药组织培养研究进展[J]. 长江蔬菜, 2007(3):39-41.
- [15] 李守岭,庄南生. 植物花药培养及其影响因素研究进展[J]. 亚热带植物科学, 2006, 35(3):76-80.
- [16] PHIPPINE C, OEKNDON D J. Genotype, plant, bud size and mdeia factors affecting anther culture of cauliflower (*Brassica oleracea* var. *botrytis*) [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 1990, 19(1):33-38.
- [17] 陈佳. 苦瓜花药培养诱导愈伤组织及器官分化的研究[D]. 雅安:四川农业大学, 2007.
- [18] 王博. 苦瓜花药培养愈伤组织诱导和分化研究[D]. 雅安:四川农业大学, 2009.
- [19] 喻财铃. 丝瓜小孢子囊与雄配子体发育的研究和花药离体培养初探[D]. 广州:华南农业大学, 2001.
- [20] 陈红,秦瑞珍. 水稻花药培养过程中各种影响因子的研究进展[J]. 中国农业科技导报, 2007, 9(3):52-56.
- [21] 苏华,金宝燕,任华中. 黄瓜单倍体育种的研究进展[J]. 农业工程学报, 2005, 21(S2):13-15.

(责任编辑:陈海霞)