

## AgNO<sub>3</sub>对网纹甜瓜试管苗再生和玻璃苗产生的影响

齐红岩\*, 陈岩, 刘雪超

沈阳农业大学园艺学院, 辽宁省设施园艺重点实验室, 沈阳 110866

**摘要:**以网纹甜瓜品种‘中蜜1号’为试材,在其不同培养阶段添加不同浓度AgNO<sub>3</sub>,检测不定芽的诱导率和增殖率、玻璃苗发生率和生根情况的结果表明,添加AgNO<sub>3</sub>后,子叶的愈伤组织诱导率下降,添加70 μmol·L<sup>-1</sup> AgNO<sub>3</sub>可促进不定芽的诱导,50~60 μmol·L<sup>-1</sup> AgNO<sub>3</sub>明显促进不定芽增殖,并完全抑制玻璃苗的产生,添加50 μmol·L<sup>-1</sup> AgNO<sub>3</sub>的生根最好。

**关键词:**网纹甜瓜;试管苗再生;玻璃化;AgNO<sub>3</sub>

## Effect of AgNO<sub>3</sub> on Plantlet Regeneration and Vitrification of Netted Melon (*Cucumis melo* L.) in vitro

QI Hong-Yan\*, CHEN Yan, LIU Xue-Chao

Key Laboratory of Protected Horticulture of Liaoning Province, College of Horticulture, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China

**Abstract:** The netted melon ‘No.1 Zhongmi’ was used in this experiment. Adventitious shoot induction, proliferation, vitrification and rooting of plantlets were investigated in different culture stages with different AgNO<sub>3</sub> concentrations. The results showed that cotyledon callus induction rate was inhibited with AgNO<sub>3</sub> addition. Adventitious shoot induction was promoted by addition of 70 μmol·L<sup>-1</sup> AgNO<sub>3</sub>. Adventitious shoot proliferation was improved obviously by 50–60 μmol·L<sup>-1</sup> AgNO<sub>3</sub> and vitrification shoot formation was also inhibited completely. Root induction was significantly improved by 50 μmol·L<sup>-1</sup> AgNO<sub>3</sub>.

**Key words:** netted melon (*Cucumis melo* L.); plantlet regeneration; vitrification; silver nitrate

在植物组织培养过程中,经常出现一种畸形和半透明状的超度含水态的试管苗,即玻璃化苗,这种苗难以增殖成芽和生根,移栽成活率低(卜学贤和陈维伦 1987; Paques 和 Boxus 1987)。外植体类型、取材部位、外界环境条件、矿质元素、培养基中的琼脂和蔗糖浓度以及植物生长调节剂等因素都可影响玻璃苗的发生(Kataeva 等 1991; Kevers 等 2004)。张洪胜等(1991)认为,在试管苗玻璃化过程中,乙烯可引发其他激素在质和量上的改变以及有关酶类及其活性的变化,以致纤维素和木质素的合成受阻和降解,叶绿素分解并发生黄化现象,最终导致形成玻璃化症状。金波和东惠茹(1995)的结果也表明,甜瓜种子萌发后逐渐大量释放乙烯,培养 2 d 时其浓度可达 0.28 mg·L<sup>-1</sup>,并认为这可能是甜瓜易发生玻璃化的原因之一。AgNO<sub>3</sub> 是乙烯活性抑制剂,这在组织培养和遗传转化研究中已得到验证(周敏和庄东红 2002)。张鹏等(1997)以及 Bleecker 和 Kende (2000)认为,AgNO<sub>3</sub> 是以竞争性作用于乙烯作用部位而促进器官和体细胞胚胎发生的。其作用主要表现为抑制愈伤组织形成,增加外

植体产生不定芽的数目及提高植株再生频率,这在其它植物离体培养中也已得到证实(Ozudogru 等 2005; Ozden-Tokatli 等 2005; Akasaka-Kennedy 等 2005)。周音等(2000)研究生菜遗传转化的结果表明,加入 2.0 mg·L<sup>-1</sup> AgNO<sub>3</sub> 可有效防止生菜玻璃苗的产生。近年来,有关甜瓜组织培养和遗传转化的研究较多(侯丽霞等 2007; 胡莹等 2009),在甜瓜组织培养过程中玻璃化的发生是很普遍的现象(朱新霞等 2006; 戴圆圆等 2008)。关于 AgNO<sub>3</sub> 对网纹甜瓜玻璃化影响的研究较少,因此,本文以网纹甜瓜子叶为外植体,研究了乙烯抑制剂 AgNO<sub>3</sub> 对其试管苗再生和玻璃化苗产生的影响,以期能为克服植物组培中试管苗的玻璃化提供参考。

### 材料与方法

试验于 2008 年 5 月在本校园艺科研基地组培

收稿 2009-08-03 修定 2009-10-12

资助 国家科技支撑计划(2006BAD07B04)。

\* 通讯作者(E-mail: hyqiaaa@126.com; Tel: 024-88487166)。

实验室进行,以网纹甜瓜(*Cucumis melo* L.)品种‘中蜜1号’种子(中国农科院蔬菜花卉所提供)为外植体,用70%酒精浸泡30 s,无菌水冲洗3次,放入0.1%升汞中消毒10 min,无菌水冲洗5次,去壳,接种于MS培养基(内加30 g·L<sup>-1</sup>蔗糖和7 g·L<sup>-1</sup>琼脂,pH为5.8)上,于培养温度为(24±2) °C、光照强度为30~40 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>和光照时间为14 h·d<sup>-1</sup>的条件下诱导发芽。

诱导不定芽时,取7 d左右的无菌苗子叶,接种在添加不同浓度AgNO<sub>3</sub>(0、20、30、40、50、60、70、80、90和100 μmol·L<sup>-1</sup>)的诱导培养基MS+2.0 mg·L<sup>-1</sup>BA+0.2 mg·L<sup>-1</sup>IAA上。每处理6瓶,培养30 d后,统计愈伤组织诱导率、不定芽诱导率和玻璃化百分率。做不定芽增殖试验时,将诱导出的不定芽接种在添加不同浓度AgNO<sub>3</sub>(0、20、30、40、50、60、70、80、90和100 μmol·L<sup>-1</sup>)的增殖培养基MS+0.4 mg·L<sup>-1</sup>BA+0.05 mg·L<sup>-1</sup>IBA上。每处理9瓶,培养30 d后,统计增殖芽数和玻璃苗发生率。生根培养时,将继代培养中长出2~3片叶的小苗,转入添加不同浓度AgNO<sub>3</sub>(0、20、30、40、50、60和70 μmol·L<sup>-1</sup>)的生根培养基MS+0.2 mg·L<sup>-1</sup>IBA上。每处理9瓶,培养30 d后,统计试管苗的生根率。各阶段均采用随机区组设计,重复3次。数据用DPS数据处理软件进行统计分析。

## 结果与讨论

### 1 不同浓度AgNO<sub>3</sub>对不定芽诱导的影响

由图1可以看出,诱导培养基中添加AgNO<sub>3</sub>后,各处理的愈伤组织诱导率均显著下降。70 μmol·L<sup>-1</sup> AgNO<sub>3</sub>处理的不定芽诱导率最高,达62.5%,显著高于其他处理。AgNO<sub>3</sub>浓度为40、50和60 μmol·L<sup>-1</sup>处理的不定芽诱导率均显著提高,且高于其他处理,而AgNO<sub>3</sub>浓度过低(<30 μmol·L<sup>-1</sup>)和过高(>80 μmol·L<sup>-1</sup>)不定芽诱导率均较低。赵巧阳和赖钟雄(2008)曾报道,在诱导培养基中添加1~10 mg·L<sup>-1</sup> AgNO<sub>3</sub>可促进小麦、玉米、甘蓝和拟南芥等离体植株再生。本文结果表明,不定芽诱导的最佳AgNO<sub>3</sub>浓度为70 μmol·L<sup>-1</sup>(11.9 mg·L<sup>-1</sup>),比一般认为的适宜浓度稍微高了一些,这可能是作物种类不同之故。

### 2 不同浓度AgNO<sub>3</sub>对不定芽增殖的影响

由图2可以看出,随着增殖培养基中AgNO<sub>3</sub>浓

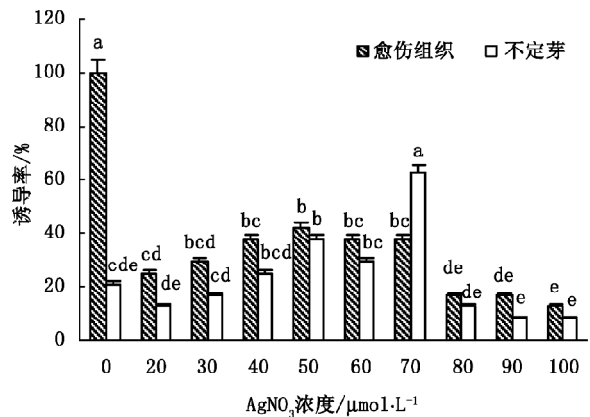


图1 不同浓度AgNO<sub>3</sub>对网纹甜瓜愈伤组织和不定芽诱导率的影响

Fig.1 Effect of different AgNO<sub>3</sub> concentrations on callus and adventitious shoot induction in netted melon

度的增加,不定芽增殖率和增殖系数逐渐增加,AgNO<sub>3</sub>浓度为50、60和70 μmol·L<sup>-1</sup>的增殖率分别为88.9%、92.6%和96.3%;增殖系数分别为3.6、3.7和4,与其他处理的差异显著。50和60 μmol·L<sup>-1</sup> AgNO<sub>3</sub>处理的增殖率和增殖系数差异不显著(图3-d、e)。AgNO<sub>3</sub>浓度为70 μmol·L<sup>-1</sup>的产生畸形变态芽(图3-f),AgNO<sub>3</sub>浓度高于80 μmol·L<sup>-1</sup>时,不定芽增殖率和增殖系数均显著下降,产生畸形芽(图3-g),与王文星等(2006)的结果一致。这可能是过高浓度的AgNO<sub>3</sub>对植物有毒害作用所致。据此认为,50~60 μmol·L<sup>-1</sup>(8.5~10.2 mg·L<sup>-1</sup>) AgNO<sub>3</sub>是诱导不定芽增殖的合适浓度。

### 3 不同浓度AgNO<sub>3</sub>对试管苗生根的影响

由图4可以看出,生根培养基中添加AgNO<sub>3</sub>可促进试管苗生根,其中50和70 μmol·L<sup>-1</sup> AgNO<sub>3</sub>处理的主根数分别为3.3和3.7,显著高于其他处理。AgNO<sub>3</sub>浓度为50 μmol·L<sup>-1</sup>(8.5 mg·L<sup>-1</sup>)的生根率为94.4%,显著高于不添加AgNO<sub>3</sub>的生根率(图3-j、k)。

### 4 不同浓度AgNO<sub>3</sub>对玻璃苗发生的影响

由图5可以看出,培养基中添加不同浓度AgNO<sub>3</sub>均显著抑制玻璃苗的发生。在不定芽诱导阶段,AgNO<sub>3</sub>大于60 μmol·L<sup>-1</sup>(10.2 mg·L<sup>-1</sup>)即完全抑制玻璃苗的产生(图3-a~c)。在不定芽增殖阶段,AgNO<sub>3</sub>浓度大于40 μmol·L<sup>-1</sup>(6.8 mg·L<sup>-1</sup>)的玻璃化率为0(图3-d、e、h、i);据此认为,50~60 μmol·L<sup>-1</sup>(8.5~10.2 mg·L<sup>-1</sup>) AgNO<sub>3</sub>是不定芽再生的合适浓

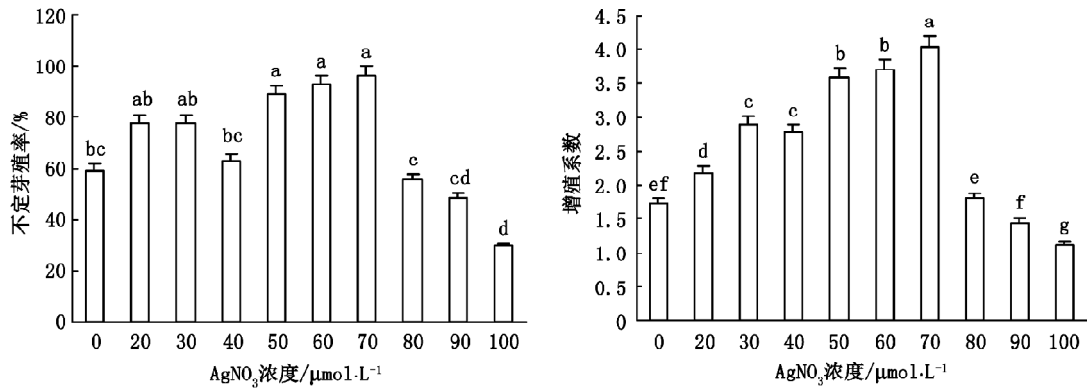


图2 不同浓度 AgNO<sub>3</sub> 对网纹甜瓜不定芽增殖的影响

Fig.2 Effect of different AgNO<sub>3</sub> concentrations on adventitious shoot multiplication in netted melon

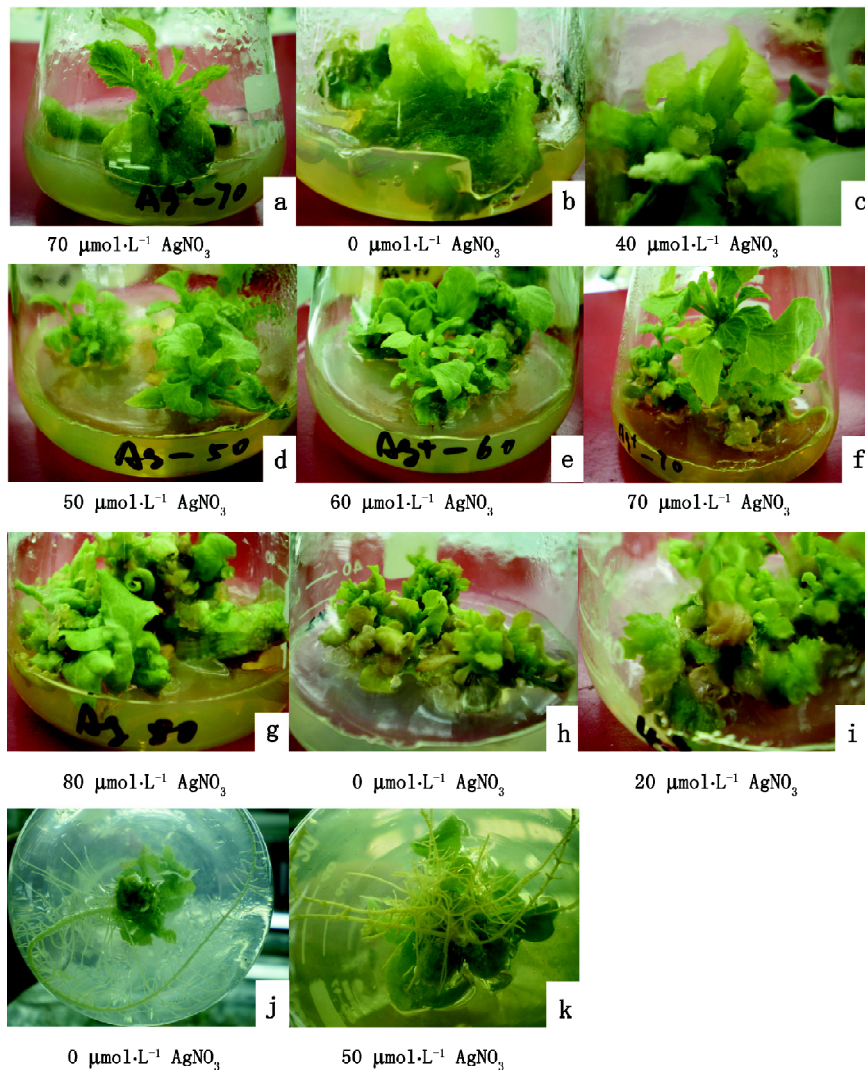
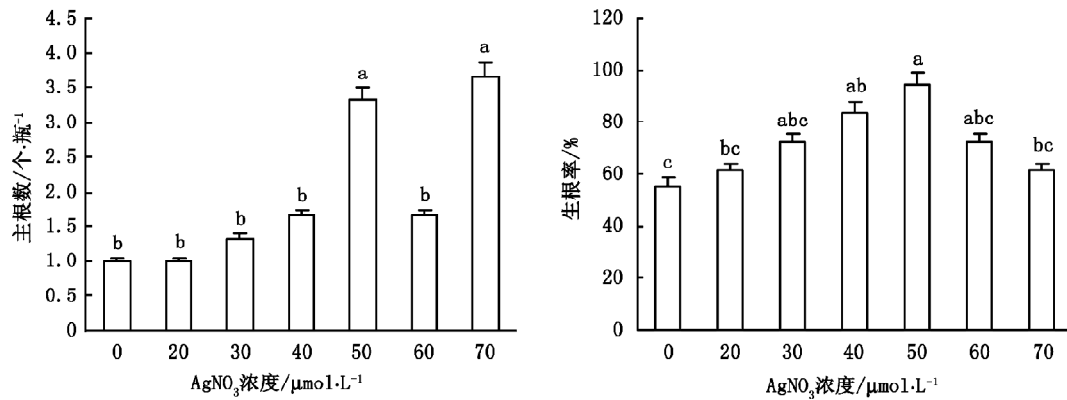
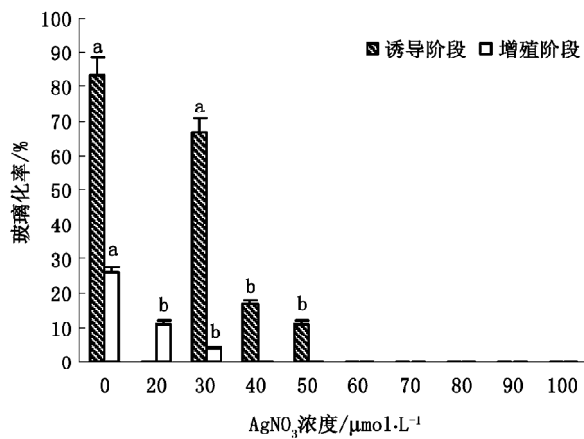


图3 不同浓度 AgNO<sub>3</sub> 对网纹甜瓜试管苗再生和玻璃苗产生的影响

Fig.3 Effect of different AgNO<sub>3</sub> concentrations on plantlet regeneration and vitrification shoot formation in netted melon

a: 诱导阶段正常苗; b、c: 诱导阶段玻璃苗; d、e: 增殖阶段正常苗; f、g: 增殖阶段畸形苗; h、i: 增殖阶段玻璃苗; j、k: 生根阶段。

图4 不同浓度 AgNO<sub>3</sub> 对网纹甜瓜试管苗生根的影响Fig.4 Effect of different AgNO<sub>3</sub> concentrations on plantlet rooting in netted melon图5 不同浓度 AgNO<sub>3</sub> 对网纹甜瓜试管苗玻璃化的影响Fig.5 Effect of different AgNO<sub>3</sub> concentrations on plantlet vitrification in netted melon

度。但是,植物组织培养过程中玻璃苗发生的原因很复杂,研究时间也已很久,其生理机制还需进一步研究。

### 参考文献

- 卜学贤,陈维伦(1987). 试管植物的玻璃化现象. 植物生理学通讯, (5): 13~18
- 戴园园,孙永林,周晓阳(2008). 甜瓜试管苗继代培养玻璃化现象的研究. 生物学杂志, 25 (2): 48~49
- 侯丽霞,何启伟,卜丽霞,焦自高,董玉梅,王崇启(2007). 甜瓜组织培养及遗传转化研究进展. 中国瓜菜, (4): 25~28
- 胡莹,冷平,王福军,马斌,修莉莉(2009). 京玉1号甜瓜高效再生体系的建立. 中国农业大学学报, 14 (1): 99~103
- 金波,东惠茹(1995). 华来士甜瓜种子萌发过程中的生理生化变化. 中国西瓜甜瓜, (1): 15~16
- 王文星,屈山,曹成有,徐淑坤(2006). 硝酸银对离体培养烟草叶片愈伤组织形成和芽再生及其脯氨酸和丙二醛含量的影响.

植物生理学通讯, 42 (4): 668~670

- 张洪胜,牟云官,辛培刚(1991). 苹果离体培养中试管苗玻璃化现象发生机理的探讨. 果树科学, 8 (2): 71~74
- 张鹏,傅爱根,王爱国(1997). 硝酸银在植物离体培养中的作用及可能的机制. 植物生理学通讯, 33 (5): 376~379
- 赵巧阳,赖钟雄(2008). AgNO<sub>3</sub> 在离体培养和转化中的作用及其机理. 亚热带农业研究, 4 (1): 62~66
- 周敏,庄东红(2002). 谷氨酰胺和硝酸银对花生幼叶芽再生的促进作用. 植物生理学通讯, 38 (3): 240~241
- 周音,张智奇,张建军,殷丽青(2000). 生菜遗传转化过程中克服玻璃苗的研究. 吉林农业大学学报, 22 (2): 62~64
- 朱新霞,孙黎,陶春萍(2006). 甜瓜离体再生继代培养中玻璃化现象的研究. 西北植物学报, 26 (7): 1468~1472
- Akasaka-Kennedy Y, Yoshida H, Takahata Y (2005). Efficient plant regeneration from leaves of rapeseed (*Brassica napus* L.): the influence of AgNO<sub>3</sub> and genotype. Plant Cell Rep, 24: 649~654
- Bleecker AB, Kende H (2000). Ethylene: a gaseous signal molecule in plants. Annu Rev Cell Dev Biol, 16: 1~18
- Kataeva NV, Alexandrova IG, Butenko RG, Dragavtceva EV (1991). Effect of applied and internal hormones on vitrification and apical necrosis of different plants cultured *in vitro*. Plant Cell Tiss Org Cult, 27: 149~154
- Kevers C, Franck T, Strasser RJ, Dommes J, Gaspar T (2004). Hyperhydricity of micropropagated shoots: a typically stress-induced change of physiological state. Plant Cell Tiss Org Cult, 77: 181~191
- Ozden-Tokatli Y, Ozudogru EA, Akcin A (2005). *In vitro* response of pistachio nodal explants to silver nitrate. Sci Hort, 106: 415~426
- Ozudogru EA, Ozden-Tokatli Y, Akcin A (2005). Effect of silver nitrate on multiple shoot formation of Virginia-type peanut through shoot tip culture. In Vitro Cell Dev Biol-Plant, 41 (2): 151~156
- Paques M, Boxus P (1987). Vitrification: review of literature. Acta Hort, 212: 155~166