

猕猴桃实生苗组织培养的研究

周玲艳¹, 秦华明², 赖幸韵¹, 陈楚欢¹, 梁红¹

(1. 仲恺农业技术学院生命科学院, 广州 510225; 2. 暨南大学理工学院, 广州 510623)

摘要:分别以猕猴桃实生苗的叶片、茎段和叶柄为材料, 研究了不同激素组合和浓度对不同程度愈伤组织诱导、不定芽分化和平均出苗率的影响。结果表明:茎段、叶柄比叶片容易脱分化, 而不同外植体的不定芽分化率和平均出苗率与激素组合和浓度有关, 当 ZT 为 1.0mg/L, NAA 为 0.1mg/L 时, 茎段和叶柄愈伤组织诱导率和不定芽率均为 100%, 平均出苗率达到最高值, 分别为 15.28 个/外植体和 13.08 个/外植体; 当 BA 为 3.0mg/L, NAA 为 0.5mg/L 时, 叶片愈伤组织诱导率和不定芽率均为 100%, 平均出苗率达到最高值, 为 15 个/外植体。

关键词:猕猴桃; 实生苗; 外植体; 愈伤组织; 不定芽

中图分类号:S 663.403.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2007)05-0198-03

猕猴桃富含多种人体必需的氨基酸、矿物质及其它有效成分, 是一种优质的药用果品, 系统开展其组织培养研究具有重要的意义。目前世界上猕猴桃的品种很多, 但真正各方面性状都比较优秀的品种却很少, 开展其组织培养研究有利于保存各种不同猕猴桃的优良性状, 这些种质资源的保存为新优良猕猴桃品种的培育奠定了基础; 而且, 一些种类的果实品质仍需改进^[1], 基因工程是改进猕猴桃果实品质的手段, 而组织培养及植株再生系统的建立^[2~4]是实施基因工程的重要基础, 其为猕猴桃品种改良提供高频再生体系。另外, 组织培养技术在猕猴桃中的开展, 有利于快速繁殖大量的优质种苗。

许多研究表明, 用实生苗作起始材料诱导愈伤组织, 植株再生效应较好^[5,6]。朱道圩对建立猕猴桃实生苗培养系统做了相关研究^[7]。该研究以猕猴桃实生苗为材料, 对不同激素组合和外植体种类对猕猴桃愈伤组织诱导、不定芽分化及平均出苗率的影响进行了初步研究。

1 材料与方法

1.1 材料

美味猕猴桃(*Actinidia deliciosa*)的饱满成熟种子。

1.2 方法

1.2.1 实生苗的获得

将种子洗净后, 用 2.5mg/L 的

赤霉素溶液处理 5h, 将经赤霉素处理过的种子用 2% 的次氯酸钠消毒 15min, 灭菌水冲洗 3~5 次, 然后将种子用镊子接种于 MS 基本培养基中进行发芽。待小苗出现两片绿色子叶时, 将其转入生根培养基生根培养。

1.2.2 不同外植体最佳激素组合的筛选 待小植株长至 8cm 高, 切取猕猴桃实生苗的叶片、叶柄和不带腋芽的茎段分别接入不同激素组合的培养基中, 叶片切成大约 0.5cm×0.5cm 大小的小方块, 叶柄和茎段大约 0.5cm 长。基本培养基为 MS, 激素组合共分三组, 激素种类和浓度组合如表 1。

1.2.3 有关指标的调查方法 愈伤组织的诱导率(%)=(产生愈伤组织的外植体数/接种外植体数)×100%; 不定芽的分化率(%)=(产生不定芽的外植体数/接种外植体数)×100%; 平均出芽数=外植体产生的不定芽数/接种外植体数。

表 1 不同激素和浓度的组合类型

	A 组合	B 组合	C 组合
1	BA 1.0mg/L, NAA 0.1mg/L	KT 1.0mg/L, NAA 0.1mg/L	ZT 1.0mg/L, NAA 0.1mg/L
2	BA 1.0mg/L, NAA 0.5mg/L	KT 1.0mg/L, NAA 0.5mg/L	ZT 1.0mg/L, NAA 0.5mg/L
3	BA 3.0mg/L, NAA 0.1mg/L	KT 3.0mg/L, NAA 0.1mg/L	ZT 3.0mg/L, NAA 0.1mg/L
4	BA 3.0mg/L, NAA 0.5mg/L	KT 3.0mg/L, NAA 0.5mg/L	ZT 3.0mg/L, NAA 0.5mg/L
5	BA 5.0mg/L, NAA 0.1mg/L	KT 5.0mg/L, NAA 0.1mg/L	ZT 5.0mg/L, NAA 0.1mg/L
6	BA 5.0mg/L, NAA 0.5mg/L	KT 5.0mg/L, NAA 0.5mg/L	ZT 5.0mg/L, NAA 0.5mg/L

2 结果

2.1 不同激素组合对猕猴桃茎段培养的影响

茎段的愈伤组织起始较早, 一般接入培养基 1 周左右开始从切口处形成愈伤组织, 培养 2 周左右茎段基部完全愈伤组织化, 并开始分化形成绿点, 进一步分化形成小苗。对 A 组合而言, 不同浓度激素组合的培养基愈伤组织诱导率和分化率均为 100%, 但平均芽数有差异, 最高是 A4, 达到 10.32 个/外植体, 其次是 A1 和 A6, 平

第一作者简介:周玲艳(1972-), 女, 讲师, 湖南衡阳人, 在读博士研究生, 主要从事植物生物技术研究。

基金项目:广东省科技攻关资助项目; 猕猴桃资源保护及开发利用(2005B60301010); 利用 AFLP 筛选与猕猴桃性别相关的分子标记(G3051312)。

收稿日期:2007-01-10

均每个外植体的芽分化数分别为 8.21 和 8.83,最低的是 A5,只有 2.8 个不定芽/外植体,这可能与生长素和细胞分裂素浓度的比例失调有关。对于 B 组合来说,愈伤组织诱导率尽管不如 A 组合高,但最高的也达到 100%,最低的有 87.5%,且该激素组合培养基上形成的愈伤组织增殖很快,最后整块外植体全部愈伤组织化,该组合中不定芽分化率和再生苗数较低,分化率和平均芽数最高的是 B3,分别为 52.5%和 2.16,还没有达到 A 组合的最低值。对于 C 组合而言,愈伤组织诱导率也较高,几乎都为 100%,愈伤组织的大小介于 A 组合和 B 组合之间,但再生频率和平均苗数相差较大,再生频率和平均苗数最高的是 C1,分别为 100%和 15.28,C6 的再生频率最低只有 40%,但其平均苗数为 7.8,不属于最低,平均苗数最低的是 C4,只有 3.14。从 3 种激素组合总体来看,无论是愈伤组织诱导还是再生频率,BA 是最好的,ZT 其次,KT 效果是最差的;平均出苗数最高的是 C 组合中 C1;同种组合中不同激素浓度对不定芽分化率和平均出芽数的影响比对愈伤组织诱导的影响要大;另外,如果获得较多愈伤组织为目的,可使用 B 组合,其中的 B2、B3 和 B4 的诱导率均为 100%,且愈伤组织增殖较快,愈伤组织数量较多。

表 2 不同激素组合对茎段培养的影响

激素组合	外植体数	愈伤组织诱导率(%)	不定芽分化率(%)	平均芽数
A1	48	100	100	8.21
A2	41	100	100	6.63
A3	41	100	100	5.54
A4	44	100	100	10.32
A5	35	100	100	2.8
A6	40	100	100	8.83
B1	40	87.5	12.5	0.3
B2	32	100	12.5	0.41
B3	40	100	52.5	2.18
B4	36	100	11.11	0.52
B5	40	97.5	47.5	1.43
B6	40	97.5	47.5	1.18
C1	32	100	100	15.28
C2	40	100	95	5.05
C3	40	100	97.5	12.58
C4	28	100	75	3.14
C5	41	97.56	87.8	5.02
C6	30	100	40	7.8

2.2 不同激素组合对猕猴桃叶片培养的影响

叶片接种后继续伸长增大至大约原来体积的 2 倍,10~15d 左右切口处产生少许愈伤组织并逐渐增大,颜色浅绿,质地致密,愈伤组织一般首先从叶脉的切口处产生,培养 3 周后,叶片表面也有少量愈伤组织形成,培养 3 周左右从愈伤组织开始出现绿点,并很快形成不定芽,尽管叶片形成愈伤组织和不定芽分化比叶柄和茎段慢,但一旦开始形成不定芽,那么分化的速率非常快。不同激素组合对美味猕猴桃叶片离体培养有显著影响。结果表明,A 组合对叶片愈伤组织诱导和不定芽分化是最佳的,不同浓度组合的诱导率和分化率均达到 100%,叶片在该组合培养基上首先形成少量愈伤组织,愈伤组织大约为米粒大小时就开始出现绿点,并很快分化成

芽,有时叶片未愈伤组织化处也分化形成芽丛,一个叶片外植体分化形成芽丛多时达到 40~50 个小苗;C 组合愈伤组织诱导率达到或接近 100%,但外植体分化率相差较大,最高达到 100%,最低达到 30%,平均出苗数相对来说也较低,最高的是 C1,为 5.33,最低的只有 0.48。B 组合无论从愈伤组织诱导、不定芽分化率还是平均出芽率来说均是最差的,其中,B1 和 B2 不定芽分化率为 0,而平均出苗率最高的也只有 1.25。B 和 C 组合叶片愈伤组织增殖较快。由此可见,猕猴桃叶片培养以 BA 和 NAA 组合明显优于 KT 及 ZT 和 NAA 的组合。

表 3 不同激素组合对叶片培养的影响

激素组合	外植体数	愈伤组织诱导率(%)	不定芽分化率(%)	平均出苗率
A1	32	100	100	7.76
A2	32	100	100	12.05
A3	32	100	100	6.85
A4	32	100	100	15
A5	32	100	100	5.55
A6	32	100	100	10.8
B1	32	37.5	0	0
B2	28	71.4	0	0
B3	25	92	4	0.16
B4	34	94.12	17.6	0.5
B5	41	85.37	38.10	0.68
B6	40	100	57.5	1.25
C1	36	100	83.33	5.33
C2	40	95	72.5	1.4
C3	28	100	100	5.5
C4	28	100	64.7	2.18
C5	40	100	93.75	4.47
C6	40	100	30	0.48

2.3 不同激素组合对叶柄不定芽分化的影响

将叶柄切段接种在含有不同激素组合的培养基上,经 3d 培养,外植体切口处开始膨大外凸,一周后叶柄切段在切口处产生少量淡绿色愈伤组织,出现愈伤组织的时间比茎段稍晚。两周后,愈伤组织上出现多个白色芽点,进一步形成不定芽。叶柄愈伤组织化程度较高,除 B1 培养基外,其他培养基上的叶柄愈伤组织诱导率均在 92%以上,但不定芽分化率和平均出苗率相差较大,在 A 组合即附加 BA 的培养基上,外植体均有不定芽的分化,其中,A4 培养基上不定芽率可达 11.11 个不定芽/外植体,平均出苗率最低的 A5 培养基也达到 3.81 个芽/外植体。B 组合除个别激素浓度组合外,愈伤组织诱导率也较高,但愈伤组织增殖较快,最后整个外植体均愈伤组织化,不定芽分化率和再生苗数较低,分化率和平均芽数最高的是 B5,分化是 20%和 0.38,不及 A 和 C 组合的最低值,有些培养基(B1 和 B2)继续培养未见不定芽分化。C 组合愈伤组织诱导率也几乎为 100%,愈伤组织大小介于 A 组合和 B 组合之间,外植体再生频率和平均出苗数相差较大,再生频率和平均苗数最高的是 C1,分别为 100%和 13.05,再生频率最低的是 C4,只有 47.2%,平均苗数最低的是 C6,只有 2.0。从叶柄培养的三种激素组合来看,无论从愈伤组织诱导和再生频率来看,A 组合是最好的,其次是 C 组合;C 组合中 C1 的平均出苗数是最高的,达到 13.05。

表4 不同激素组合对叶柄不定芽分化的影响

激素组合	外植体数	愈伤组织诱导率(%)	不定芽分化率(%)	平均出苗率
A1	41	100	100	5.05
A2	39	100	100	9.77
A3	41	100	100	7.44
A4	36	100	100	11.11
A5	32	100	100	3.81
A6	44	100	100	6.30
B1	27	48.1	0	0
B2	27	100	0	0
B3	40	100	7.5	0.18
B4	38	94.74	5	0.11
B5	40	97.5	20	0.38
B6	40	92.5	7.5	0.15
C1	32	100	100	13.05
C2	36	97.22	97.22	6.28
C3	40	97.5	82.05	6.98
C4	36	100	47.22	2.44
C5	40	100	80	5.98
C6	40	97.5	65	2

3 讨论

3.1 激素在猕猴桃培养中的作用

激素的种类对愈伤组织诱导和不定芽形成的影响很大。ZT 曾经被发现有利于猕猴桃不定芽的再生^[8~10]。张远记等^[11]报道 ZT 对软枣猕猴桃愈伤组织的芽分化效果最好,金魁猕猴桃^[12]、中华猕猴桃^[13]和美味猕猴桃^[14]等也有类似报道。BA 也曾被报道对某些猕猴桃种的不定芽再生很有效^[15,16]。樊军锋^[17]发现秦美猕猴桃在诱导不定芽过程中,BA 的诱导效果要强于 ZT。试验发现猕猴桃愈伤组织诱导和不定芽分化与激素组合种类和浓度有较大相关性。其中,同种激素不同浓度组合对愈伤组织诱导率相差不大,但不定芽分化率相差较大,特别是平均出苗数。KT 组合出现愈伤组织的时间以及愈伤组织增殖较快,乃至最后整个外植体全部愈伤组织化,该组合愈伤组织出苗最快,但当愈伤组织出苗后,并没有出现苗数增加,而是愈伤组织快速增殖;ZT 组合出现愈伤组织速度最慢,但有些激素组合的愈伤组织也增殖非常快,ZT 组合的外植体愈伤组织化后需要一定时间才出苗,且不同浓度组合出苗率和出苗数相差较大;而 BA 组合出现愈伤组织速度中等,愈伤组织生长较慢,BA 组合出苗最慢,但一旦愈伤组织出苗后,每块愈伤组织的出苗数会快速显著增加。不同外植体不定芽分化对激素反应效果不同,一定浓度的 ZT 与 NAA 组合对叶柄和茎段出苗有利,而一定浓度的 BA 与 NAA 组合对叶片的出苗有利。

3.2 外植体在猕猴桃培养中的作用

外植体再生能力不同早有报道^[18,19],可能是不同外植体中细胞的分化程度不同,所以脱分化和再分化难易程度不同。试验发现叶柄、茎段比叶片容易脱分化,但再生频率与激素水平和组合有关,可能与不同外植体来源不同,其内源激素水平不同有关。叶片的愈伤组织大多数首先在叶脉和叶缘的切口处产生,Mushtaq 等人^[20]也报道了此类现象,并解释说可能外植体边缘容易从培养基中吸收有效的营养和激素所导致的。Nabila 等

人^[21]报道同一叶盘绿色的小芽点首先出现在中脉形成的愈伤组织上,试验有同样发现。猕猴桃叶柄和茎段培养中,叶柄和茎段切段两端伤口首先形成愈伤组织,然后由愈伤组织分化形成不定芽。

参考文献:

- [1] 朱道圩. 猕猴桃遗传育种研究现状及展望[J]. 河南农业大学学报, 1995, 29(4): 326-328.
- [2] 朱道圩. 软枣猕猴桃叶片愈伤组织分化再生植株[J]. 植物生理学通讯, 1997, 33(2): 127-128.
- [3] 朱道圩, 秦永华, 鄧玉宝, 等. 软枣猕猴桃原生质体培养与细胞团再生的初步研究[J]. 河南农业大学学报, 2001, 35(3): 221-224.
- [4] 胡家金, 熊兴耀, 张秋明, 等. 美味猕猴桃原生质体培养及植株再生技术研究[J]. 湖南农业大学学报, 1998, 24(3): 184-190.
- [5] 潘增光, 邓秀新, 章文才. 苹果原生质体研究进展文献综述[J]. 园艺学报, 1997, 24(3): 239-243.
- [6] 罗充, 彭抒昂. 猕猴桃原生质体研究进展[J]. 山地农业生物学报, 1998, 17(4): 243-248.
- [7] 朱道圩, 王静毅, 吕宗强. 猕猴桃实生苗组织培养体系建立的研究[J]. 落叶果树 2005, 2: 5-7.
- [8] Harada H. In vitro organ culture of *Actinidia chinensis* PL. as a technique for vegetative multiplication [J]. J Hort Sci, 1975, 50: 81-83.
- [9] Chiyomi U, Makoto M, Hiroaki I et al. Agrobacterium-mediated transformation and regeneration of kiwi fruit [J]. Plant Cell Rep, 1991, 10: 286-290.
- [10] Liu YL, Masuda K, Harada T. Plantlet Regeneration, Organ Formation and Somatic Embryogenesis from in Vitro-Cultured Root Tissue of *Actinidia kolomikta* [J]. J Japan Soc Hort Sci, 1998, 67: 734-738.
- [11] 张远记, 钱迎倩. 软枣猕猴桃试管苗叶片和段的愈伤组织诱导及植株再生[J]. 西北植物学报, 1996, 16 (2): 137-141.
- [12] 许淑琼, 葛双桃. 猕猴桃的组织培养和快速繁殖[J]. 西南园艺, 2002, 30(30): 4.
- [13] 阳小成, 王伯初. 中华猕猴桃的组织培养及其实用快速繁殖[J]. 重庆大学学报, 2002, 25(6): 75-77.
- [14] 丁士林, 朱秀珍, 余厚敏, 等. 美味猕猴桃的组织培养[J]. 中国果树, 1997(2): 27-29.
- [15] Liu YL, Kasai N, Harada T. Organ Formation and Plant Regeneration from Various Tissues of Tara Vine (*Actinidia arguta* Planch) Cultured in vitro [J]. J Japan Soc Hort Sci, 1995, 64: 261-265.
- [16] Liu YL, Namiki H, Kasai N et al Organ Formation and Plant Regeneration from Internodal Segments of *Actinidia kolomikta* Maxim. in in-vitro Culture [J]. J Japan Soc Hort Sci, 1997, 5-671-676.
- [17] 樊军锋, 李铃. 秦美猕猴桃叶片最佳再生系统的建立[J]. 西北植物学报, 2002, 22 (4): 907-912.
- [18] 余小林, 曹家树, 陈石头, 等. 提高榨菜离体培养植株再生频率仁[J]. 细胞生物学杂志, 2004, 26: 439-443.
- [19] 姜长阳, 宁淑香, 于森, 等. 蕨菜愈伤组织高效再生体系的建立[J]. 园艺学报, 2003, 30 (3): 343-34.
- [20] Mushtaq S, Skirvin RM. Effect of thidiazuron and 6-benzylaminopurine on adventitious shoot regeneration from leaves of three strains of "McIntosh" apple (*Malus domestica* Borkh.) in vitro [J]. Sci Hort, 1997, 68: 95-100.
- [21] Nabila SK, Mohannad AM. Direct shoot regeneration and microtubercization in wild *Cyclamen persicum* Mill. using seedling tissue [J]. Sci Hort, 2000, 86: 235-246.