

文章编号: 1000-5471(2007)05-0124-05

# 金富猕猴桃离体培养与植株再生的优化研究

刘长春, 陈泽雄, 龚雪芹, 刘奕清

重庆文理学院 花卉研究所 生命科学系; 重庆高校园林花卉工程研究中心, 重庆 永川 402168

**摘要:**以“金富”猕猴桃的单芽茎段为外植体进行离体培养和植株再生的优化研究。结果表明,以 MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L 作增殖继代培养基为宜,以 1/2MS+NAA 0.3 mg/L 作生根培养基为宜。适当浓度的 6-BA 对猕猴桃的不定芽增殖有明显的促进作用,而对茎伸长却有抑制作用,6-BA 和 NAA 配合使用可促进芽苗主茎伸长,对改善猕猴桃植株组培苗质量有较好的作用。炼苗移栽成活率达到 94% 以上。

**关键词:**猕猴桃; 组织培养; 植株再生; 优化研究

**中图分类号:** Q949.758.2

**文献标识码:** A

猕猴桃是原产于我国的一种野生藤本果树,属猕猴桃科(Actinidiaceae)猕猴桃属(*Actinidia*)。目前全世界猕猴桃植物约有 66 个种,118 个种下分类单位(变种,变型),我国有 62 个种<sup>[1]</sup>。随着对猕猴桃的大力开发研究和广泛的栽种,它已是一种经济价值较高的商业性果树,特别是山区退耕还林和农民脱贫致富的优选经济植物。猕猴桃具有丰富的营养价值和良好的药用价值<sup>[2]</sup>;果实中含有大量的糖、蛋白质、氨基酸以及多种有机物和人体必需的多种矿物质及维生素;尤其以维生素 C 的含量最高,远远超过柑橘、苹果、梨,故有“水果之王”、“Vc 之王”之称。

猕猴桃是雌雄异株的藤本植物,常规繁殖方式有扦插、嫁接、种子播种。然而通过嫁接繁殖优良苗木的速度有限;运用扦插繁殖成活率低,容易使植株带菌;通过种子播种繁殖的实生苗性状不稳定,又由于木本植物的花龄和果龄较长,实生苗品质分化差异也较大;长期进行常规繁殖常造成品种退化<sup>[3,4]</sup>。为了促进优良品种的推广应用,对猕猴桃良种进行离体克隆繁殖是一种有效的途径。

本试验采用金富猕猴桃带腋芽的茎段作外植体,通过离体培养技术快速繁殖猕猴桃优良品种,建立了高效离体无性繁殖体系,获得的再生植株不仅品种性状稳定、保持亲本优良特征,而且大大缩短繁殖周期,为其良种克隆育苗奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料

于春季在重庆市石笋山生态农业有限公司果园采集优良品种金富猕猴桃的当年生嫩枝作外植体,选取生长旺盛、健壮的半木质化新梢,剪除叶片,放入保鲜袋,置于冰箱中临时保存备用。

### 1.2 外植体的处理

将低温冷藏的外植体用自来水冲洗 5~8 min,剪成单芽茎段,然后用 0.2% 的洗衣粉溶液洗涤 10~12 min,再用自来水冲洗干净。随后把材料放入无菌塑料空杯中,用 75% 酒精浸泡 30 s,再用 0.1% 的升汞消毒灭菌 8~10 min,并不停地摇动杯子,使消毒更彻底,最后用无菌水清洗 4~5 次。

收稿日期: 2007-05-24

基金项目: 重庆市教委重大平台建设项目(GCZX0713), 重庆文理学院重点科研项目。

作者简介: 刘长春(1986-), 男, 重庆云阳人, 主要从事园林植物离体培养的科研工作。

通讯作者: 刘奕清, 教授。

### 1.3 试验设计

#### 1.3.1 无菌体系的建立

将消毒灭菌后的材料切割长为 1.0 cm 的带腋芽茎段,接种在 MS 附加 6-BA 为 0.5 mg/L、NAA 0.1 mg/L 的培养基上诱导腋芽的萌发。

#### 1.3.2 增殖培养

将诱导的无菌小芽接种在以 MS 为基本培养基,附加不同浓度的 6-BA(0.5, 1, 2, 4 mg/L)和 NAA(浓度为 0, 0.1 mg/L),共 6 个处理,每处理重复 3 次,每重复接种 30 个芽。试验培养 30 天后通过统计芽高、增殖系数,筛选出最佳激素组合。

#### 1.3.3 生根培养

选取生长一致的无菌芽苗(株高为  $2 \pm 0.2$  cm,茎粗 3 mm,有 2 片完全叶)接种到以 1/2MS 为基本培养基,分别附加不同种类生长素 NAA 和 IBA,浓度分别为 0.1, 0.3, 0.5, 0.7 mg/L,以检测对生根的影响。

#### 1.3.4 试管苗移栽

当试管苗的根长至 1 cm 左右,并有 5~6 条侧根时,移入温室炼苗 4~5 d,从杯中取出洗净培养基,移栽到盛有基质的育苗盘中,放置于温室之中。相对湿度 80%~90%,温度 20~27℃。

以上试验培养基中均添加琼脂 5.2 g/L,蔗糖 30 g/L, pH 6.0。

### 1.4 培养条件

光照时间为 12 h/d,光照强度为 2 000~2 500 lx,培养室温度为  $26 \pm 2$ ℃。

### 1.5 数据分析

试验所获数据用生物统计学原理<sup>[5]</sup>,采用 DPS 软件进行方差分析,经 F 检验差异显著之后,用 Duncan 新复极差法进行多重比较。

## 2 结果与分析

### 2.1 无菌芽的诱导

以单茎段作为外植体,在 MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.1 mg/L 的诱导培养基上培养,8~10 d 茎段基部开始会形成愈伤组织,并形成绿色球状突起(图 1)。15 d 后茎段基部完全愈伤组织化;20~22 d 后,可见萌发的小芽(图 2)。试验统计,萌发率为 91.25%。

### 2.2 6-BA 和 NAA 组合对增殖的影响

将无菌芽苗接种于增殖培养基中,研究不同浓度组合的 6-BA 和 NAA 对猕猴桃芽苗增殖的影响。试验结果表明,对猕猴桃的增殖系数以 MS+6-BA 4.0 mg/L 培养基为最大(6.5),以 MS+6-BA 4.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L 次之(5.8),以 MS+6-BA 0.5 mg/L 的为最小(3.2);芽苗高以 MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.1 mg/L 为最高(5.4 cm),以 MS+6-BA 4.0 mg/L 为最低(2.9 cm)(表 1)。由此可知,随细胞分裂素 6-BA 的浓度的升高,其增殖系数随之增大,芽苗基部分裂萌发的芽数呈增大的趋势;适当浓度的 6-BA 对猕猴桃的不定芽增殖有明显的促进作用,配合使用 6-BA 和 NAA 可促进芽苗主茎伸长,对改善猕猴桃再植株品质有较好的作用。综合增殖系数和苗高,以 MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L 作增殖继代培养基为宜。

表 1 不同 6-BA 和 NAA 激素浓度组合对芽苗增殖的影响

| 编号 | 6-BA/mg · L <sup>-1</sup> | NAA/mg · L <sup>-1</sup> | 接种芽数 | 增殖系数    | 苗高/cm    |
|----|---------------------------|--------------------------|------|---------|----------|
| 1  | 0.5                       | 0                        | 30   | 3.2 eD  | 4.5 bB   |
| 2  | 1                         | 0                        | 30   | 4.2 dC  | 3.9 cBC  |
| 3  | 2                         | 0                        | 30   | 5.2 bcB | 3.3 deCD |
| 4  | 4                         | 0                        | 30   | 6.5 aA  | 2.9 eD   |
| 5  | 0.5                       | 0.1                      | 30   | 4.2 dC  | 5.4 aA   |
| 6  | 1                         | 0.1                      | 30   | 4.3 dC  | 3.8 cdBC |
| 7  | 2                         | 0.1                      | 30   | 5.0 cBC | 3.7 cdCD |
| 8  | 4                         | 0.1                      | 30   | 5.8 bAB | 3.4 deCD |



图 1 愈伤组织

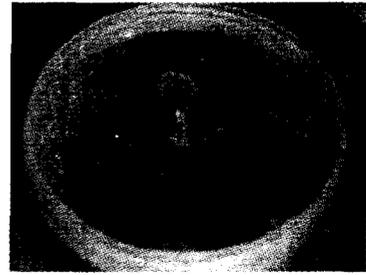


图 2 再生芽

## 2.3 NAA 和 IBA 对猕猴桃生根的影响

### 2.3.1 NAA 浓度对根的诱导

根系的质量是影响试管苗成活的关键. 把高 $\geq 2.0$  cm、茎粗 3.0 mm 的再生芽苗接种于表 2 的生根培养基(图 3)中, 研究 NAA 对猕猴桃再生芽苗生根的作用. 芽苗在 NAA 不同浓度的培养基中培养 40 d 之后, 其株高、平均根长、每株根数和生根率均随浓度的增高而呈现出上升趋势(表 2). 方差分析表明, 不同 NAA 浓度对芽苗的生长高度、生根量数和生根率有显著或极显著影响. 0.3, 0.5, 0.7 mg/L 的 NAA 3 个试验浓度处理之间其生根率无显著差异, 生根率达 81.4%~85.5%, 与其它处理之间的差异显著.

表 2 NAA 浓度对试管苗生根和株高的影响

| 浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ | 株高/cm    | 平均根长/cm | 根数/条    | 生根率/%     |
|-------------------------------------|----------|---------|---------|-----------|
| 0                                   | 2.0 dD   | 1.5 dD  | 3.3 cC  | 68.9 cB   |
| 0.1                                 | 2.6 cC   | 1.8 dCD | 6.3 bB  | 74.5 bcAB |
| 0.3                                 | 2.9 bcBC | 2.3 cC  | 8.0 aAB | 81.4 abA  |
| 0.5                                 | 3.2 bB   | 3.0 bB  | 8.3 aA  | 84.8 aA   |
| 0.7                                 | 4.7 aA   | 3.8 aA  | 9.3 aA  | 85.5 aA   |

### 2.3.2 IBA 浓度对根的诱导

再生苗在 IBA 不同浓度的试验培养基中培养 40 d 之后, 各处理间无论是生根苗的苗高、最长根长、生根数量、还是生根率均存在显著或极显著差异(表 3). 其株高、平均根长、每株根数、生根率也随 IBA 浓度的升高而呈现出上升趋势. 当 IBA 为 0.0 mg/L 时, 生根数为 3.7 条/株, 生根率为 72.5%; IBA 浓度为 0.7 mg/L 时, 苗基部发根多, 根粗长, 苗也长得较高, 植株生长健壮, 生根数为 8 条/株, 生根率为 95.3%, 其生根数和生根率是在所有不同浓度中最高的, 而生根率和生根数是反映生根培养基的两个最重要的指标<sup>[6]</sup>. 纵观所有数据, IBA 浓度在 0.1~0.3 mg/L 时, 每株根数从 5 条/株上升到 5.7 条/株, 生根率从 79% 上升到 93.3%, 存在着极显著差异. IBA 浓度从 0.3~0.7 mg/L 时, 每株根数从 5.7 条/株上升到 8 条/株, 生根率从 93.3% 上升到 95.3%, 无显著差异. 这表明在培养基中加入适当浓度的 IBA 有利于猕猴桃芽苗长根和长高.

表 3 IBA 浓度对试管苗生根和株高的影响

| 浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ | 株高/cm  | 平均根长/cm | 根数/条    | 生根率/%   |
|-------------------------------------|--------|---------|---------|---------|
| 0                                   | 2.4 dC | 1.7 cC  | 3.7 cD  | 72.5 bB |
| 0.1                                 | 2.8 cB | 1.9 cBC | 5.0 bCD | 79.2 bB |
| 0.3                                 | 3.1 bB | 2.4 bB  | 5.7 bBC | 93.3 aA |
| 0.5                                 | 3.6 aA | 3.5 aA  | 7.0 aAB | 94.2 aA |
| 0.7                                 | 3.8 aA | 3.8 aA  | 8.0 aA  | 95.3 aA |

## 2.4 炼苗与移栽

试管苗移栽至大田是植物组培技术从实验室阶段过渡到有应用价值的工厂化育苗阶段的关键环节<sup>[3,5,7]</sup>. 由于试管苗是在人工条件下培育起来的, 使其形态解剖结构和生理特性与温室大棚, 特别是野外条件下生长的植株有很大的不同<sup>[8,9]</sup>. 为了适应移栽后相对恶劣多变的自然环境条件, 必须要对试管苗进

行一个逐步锻炼和适应的过程,即进行炼苗.把已长根的猕猴桃试管苗移入温室,遮光75%,炼苗4~5 d,从杯中取出洗净培养基,移植在装有泥炭+珍珠岩(体积比4:1)的基质中(图4),前10 d每天喷水3~4次,之后适量浇水,每7 d浇灌0.1%的N,P,K进口三元复合肥液一次,培养70~80 d即可移栽于花盆或营养袋及田间种植.试验统计,移栽成活率达到94%以上,商品出苗率在89%以上.

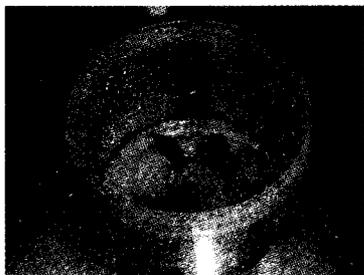


图3 生根苗



图4 驯化移栽

### 3 结论与讨论

#### 3.1 外植体灭菌与诱导

为防止某些侵入材料内部的病菌影响初代培养<sup>[10-12]</sup>,将自来水冲洗过的外植体,用0.2%的洗衣粉溶液洗涤10~12 min,再用0.1%的升汞消毒灭菌8~10 min,无菌水冲洗后接种于诱导培养基中,结果发现,用此方法处理的灭菌效果明显,污染率降低,很快得到初代培养物.

以单芽茎段作外植体诱导猕猴桃的再生植株,小芽萌发率高,达到91.25%,并且诱导时间短,成苗速度较以叶片作外植体诱导愈伤组织再长芽的快.这一结果与姜维梅、李凤玉的分别用茎段和叶片为外植体进行诱导再生芽的研究结果相一致<sup>[10]</sup>.

#### 3.2 激素与增殖

植物组织培养中,植物激素对试管苗的诱导有明显作用,不同激素组合诱导产生的试管苗在形态上存在着显著差异,这种差异的产生可能是植物激素对试管苗生长发育调控的结果<sup>[7,8]</sup>.生长素在猕猴桃组织培养中对外植体的分化起到了辅助作用,本试验研究证明,6-BA用量在2.0~4.0 mg/L时培养再生芽苗,其处理后增殖系数达到了5以上,表明适当浓度的6-BA对猕猴桃的不定芽的增殖有明显的促进作用.使用MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.1 mg/L时,芽苗高达5.4 cm,说明细胞分裂素(6-BA)和生长素和(NAA)配合使用,比例协调,可以促进芽苗主茎伸长;否则,对芽苗主茎伸长有抑制作用.综合增殖系数和苗高,增殖继代以MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L培养基为宜.该结果与樊军锋、李玲、韩一凡等的研究相一致<sup>[9]</sup>.

#### 3.3 激素与生根

对试管苗进行生根培养试验时,不同激素以及同一激素的不同浓度对试管苗的品质都会产生较大的影响.在本试验中,分别选取了不同浓度的NAA和IBA进行生根试验.结果表明,适当浓度的NAA和IBA对猕猴桃再生芽苗的生根有明显的促进作用.使用IBA 0.7 mg/L时,试管苗生根率达到95.3%,该实验结果与丁士林等<sup>[13]</sup>使用IBA能有效诱导猕猴桃试管苗生根的结论相一致,但是没有指出生长素对猕猴桃生根是必需的.使用NAA时,NAA浓度从0.1,0.3,0.5,0.7 mg/L逐渐增加,生根率从68.7%上升至85.5%,表明生根率随NAA使用浓度的增大而呈上升的趋势.试验中观察到,IBA较NAA诱导猕猴桃生根时间短.结合IBA和NAA的市场售价,作者认为猕猴桃生根以1/2MS+NAA 0.3 mg/L培养基为宜.

有关猕猴桃组培研究的报告较多,大多是关于食用猕猴桃品种改良和种质资源保存的研究.目前,已组培成功的猕猴桃种类有中华猕猴桃、美味猕猴桃、毛花猕猴桃、软枣猕猴桃、狗枣猕猴桃、葛枣猕猴桃和多花猕猴桃等.本研究将为金富猕猴桃的商品化开发奠定基础,金富猕猴桃的大规模种植,不仅可以丰富重庆市果业种类,而且对山区新农村经济的发展也将起到积极的推动作用.

**参考文献:**

- [1] 文国琴, 石大兴, 李 燕, 等. 猕猴桃组织培养的现状与进展 [J]. 北方果树, 2004, (3): 1-3.
- [2] 陈东虹. 猕猴桃的药理活性研究进展 [J]. 广东药学院学报, 2002, 18(03): 231-234.
- [3] 文国琴, 何 震. 红阳猕猴桃茎段愈伤组织诱导成苗技术 [J]. 福建林业科技, 2004, 31(4): 78-79.
- [4] BAKER F W G 主编. 速生树种的快速繁殖 [M]. 沈惠娟 译. 北京: 中国农业出版社, 1994. 66-70.
- [5] 明道绪. 生物统计附试验设计 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2001.
- [6] 谢志兵, 鲁旭东. 猕猴桃组织培养中适宜激素组合的筛选 [J]. 北方果树, 2003(3): 7-8.
- [7] 洪树荣. 猕猴桃离体茎段和叶愈伤组织的诱导和植株再生 [J]. 湖北农业科学, 1981, 9: 28-30.
- [8] 张远记, 钱迎倩. 毛花猕猴桃愈伤组织诱导与植株再生 [J]. 广西科学, 1994, 1(4): 1-5.
- [9] 樊军锋, 李 玲, 韩一凡, 等. 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.
- [10] 姜维梅, 李凤玉. 大籽猕猴桃离体再生系统的建立 [J]. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 2003, 29(3): 295-299.
- [11] LIU Y L, Marada K, Harada I. Plantlet regeneration, organ formation and somatic embryogenesis from in vitro-cultured root tissue of *Actinidia kolomikta* [J]. Japan Soc Hort Sci, 1998, 67: 734-738.
- [12] 郑秀珍. 抗菌素对猕猴桃组织培养的影响 [J]. 湖北农业科学, 1999, (3): 35-36.
- [13] 丁士林, 朱秀珍, 余后敏. 美味猕猴桃的组织培养 [J]. 中国果树, 1997, (2): 27-29.

## Studies on Optimization of the Conditions for *in vitro* Culture and Plantlet Regeneration of *Actinidia chinensis* cv. JinFu

LIU Chang-chun, CHENG Ze-xiong, GONG Xue-qing, LIU Yi-qing

Flower Research Institute, Dept. of Life Science, Chongqing University of Arts and Science,

Garden and Flower Engineering Research Center of Chongqing Colleges, Yongchuan Chongqing 402160, China

**Abstract:** Stem segments with a single bud of *Actinidia chinensis* cv. JinFu were used as explants *in culture* *in vitro* and for rapid propagation. The results indicated that MS + 6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L was a suitable medium for shoot multiplication, and the best medium for rooting was 1/2MS + INAA 0.3 mg/L. 6-BA used in proper concentrations promoted shoot multiplication but inhibited stem elongation. Combined application of 6-BA and NAA promoted the elongation of the stem segments. The survival rate of hardened regenerated plantlets was as high as 94% after transplanting.

**Key words:** *Actinidia chinensis*; tissue culture; plantlet regeneration; optimization

责任编辑 欧 宾