

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw201507025

林苗苗, 方金豹, 齐秀娟, 等. 软枣猕猴桃‘天源红’离体再生体系的建立 [J]. 广西植物, 2016, 36(11):1358-1362

LIN MM, FANG JB, QI XJ, et al. Establishment of regeneration of *Actinidia arguta* ‘Tianyuanhong’ [J]. Guihaia, 2016, 36(11):1358-1362

软枣猕猴桃‘天源红’离体再生体系的建立

林苗苗, 方金豹*, 齐秀娟, 陈锦永, 顾红, 张威远, 孙雷明

(中国农业科学院郑州果树研究所, 郑州 450009)

摘要: 为了建立快速高效的全红型软枣猕猴桃离体再生体系, 该研究以果皮、果肉均为红色的软枣猕猴桃新品种‘天源红’(*Actinidia arguta*)带腋芽茎段和幼嫩叶片、叶柄为外植体材料, 采用组织培养的方法, 研究适合其离体再生的外植体类型以及最佳植物生长物质组合。结果表明: 初春带腋芽的茎段是最好的获得无菌苗的外植体材料, 诱导腋芽出芽的最佳植物生长物质组合为 MS+6-BA 0.5 mg · L⁻¹+IBA 1.0 mg · L⁻¹; 研究发现叶柄比叶片更适合进行‘天源红’愈伤组织诱导, 叶柄诱导的最佳植物生长物质组合为 MS+ZT 0.5 mg · L⁻¹; 同时, 研究了不定芽增殖的最佳植物生长物质组合为 MS+ZT 1.0 mg · L⁻¹; 此外使用 6-BA 也可以达到较高的不定芽增殖率, 在生产上可以替代 ZT 进行不定芽分化, 即 MS+6-BA 2.0 mg · L⁻¹+IBA 0.5 mg · L⁻¹; 较适宜的生根培养基为 1/2 MS+NAA 0.2 mg · L⁻¹; 生根后的组培苗在珍珠岩: 泥炭: 细沙 = 1: 1: 1 的基质配比中能够达到 98% 的移栽成活率。该研究结果建立了全红型软枣猕猴桃的离体再生体系, 为全红型软枣猕猴桃苗木快繁、工厂化育苗提供了技术支持, 同时建立的再生体系为软枣猕猴桃遗传转化研究提供了基础。

关键词: 全红型软枣猕猴桃, 组织培养, 愈伤组织, 丛生芽

中图分类号: Q945.5 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2016)11-1358-06

Establishment of regeneration of *Actinidia arguta* ‘Tianyuanhong’

LIN Miao-Miao, FANG Jin-Bao*, QI Xiu-Juan, CHEN Jin-Yong,
GU Hong, ZHANG Wei-Yuan, SUN Lei-Ming

(Zhengzhou Fruit Research Institute, CAAS, Zhengzhou 450009, China)

Abstract: ‘Tianyuanhong’ was a new *Actinidia arguta* cultivar, with all red pericarp and pulp. In order to establish the rapid and efficient propagation system *in vitro* in ‘Tianyuanhong’, we used stem with axillary bud, young leaf and leaf stem of ‘Tianyuanhong’ as the explants, and used tissue culture methods to study explant types and the best plant growth regulator substance combination in this cultivar. The result showed that stem with axillary bud that sprout in early spring was the best explants, and MS+6-BA 0.5 mg · L⁻¹+IBA 1.0 mg · L⁻¹ was the suitable plant growth substances combination; leaf stem was the better experimental material than leaf to induce callus, MS+ZT 0.5 mg · L⁻¹ was the optimizing plant growth substances combination; the best plant growth substances combination in adventitious bud propagation was MS+ZT 1.0 mg · L⁻¹; and 6-BA could have the same effect in adventitious bud propagation, and could replace

收稿日期: 2015-12-27 修回日期: 2016-03-27

基金项目: 中国农业科学院科技创新工程专项(CAAS-ASTIP-2016-ZFRI); 河南省现代农业产业技术体系项目(S2014-11); 郑州市科技攻关项目[Supported by the Agricultural Science and Technology Innovation Program(CAAS-ASTIP-2016-ZFRI); Henan Program of Agricultural Research System(S2014-11); Zhengzhou Key Scientific and Technological Program(121PPTGG466)]。

作者简介: 林苗苗(1985-), 女, 黑龙江牡丹江人, 硕士, 助理研究员, 从事猕猴桃组织培养和栽培生理研究, (E-mail) linmiaomiao@caas.cn。

*通讯作者: 方金豹, 博士, 研究员, 从事猕猴桃栽培生理研究, (E-mail) Fangjinbao@caas.cn。

ZT for adventitious bud propagation in production, MS+6-BA 2.0 mg · L⁻¹+IBA 0.5 mg · L⁻¹ was well; 1/2 MS+NAA 0.2 mg · L⁻¹ was the best plant growth substances combination for rooting. After the seedlings rooted, transplanted the seedlings to the substrate, the seedlings could reach the 98% survival rate in the substrate with the ratio of perlite : peat soil : sand = 1 : 1 : 1. Through this study, the *in vitro* regeneration system was established in all-red *A. arguta* ‘Tianyuanhong’, which provides a good technical support for seedling micropropagation and factory nursery, at the same time, the established regeneration system provides the basis for the research of genetic transformation in all-red *A. arguta*.

Key words: all-red *Actinidia arguta*, tissue culture, callus, multiple shoot clump

软枣猕猴桃 (*Actinidia arguta*) 属于猕猴桃科 (Actinidiaceae) 猕猴桃属 (*Actinidia*), 从 20 世纪 90 年代开始人工驯化栽培, 目前生产上的软枣猕猴桃栽培品种主要以绿色为主, 红色较为少见 (齐秀娟等 2014), 与中华猕猴桃和美味猕猴桃相比, 它具有不需后熟可直接带皮食用的优点。‘天源红’ (*A. arguta*) 品种是中国农业科学院郑州果树研究所选育的国内首个果皮、果肉均为红色的软枣猕猴桃。由于其果皮、果肉均为红色的特点, 可作为遗传转化研究的较为特殊的材料。全红型软枣猕猴桃在生态农业中迅速推广, 特别是在观光果园和采摘园中很受欢迎, 具有较好的市场前景, 亟需大量的苗木, 而传统的嫁接繁殖不能满足市场需求。因此研究全红型软枣猕猴桃的离体再生体系无论对生产还是科学研究都非常必要。

关于软枣猕猴桃组织培养的研究最早的报道是 1981 年洪树荣采用软枣猕猴桃茎段诱导愈伤, 此后张远记等 (1996)、朱道圩等 (1997)、刘长江等 (2009) 采用软枣猕猴桃叶片、茎段、茎尖进行组织培养研究, 目前仅有‘魁绿’品种的组培微繁技术体系 (胡皓和张志东, 2011), 关于‘天源红’的组织培养尚未有报道。由于猕猴桃基因型复杂, 而组织培养体系又受到基因型的影响 (黄宏文等 2013), 因此需要针对‘天源红’品种筛选适宜的植物生长物质组合。本研究以‘天源红’猕猴桃叶片、叶柄和带芽茎段为材料, 通过叶片、叶柄愈伤组织的形成产生不定芽和诱导带芽茎段直接出芽两条途径获得无菌苗, 并进行增殖以及生根培养, 建立‘天源红’猕猴桃的快速繁殖体系。

1 材料与方 法

1.1 材料

试验材料为全红型软枣猕猴桃‘天源红’, 栽种于中国农业科学院郑州果树研究所猕猴桃资源圃

(34°71' N, 113°71' E)。以春季刚发芽新稍茎段、叶片和叶柄作为外植体材料。

1.2 方法

1.2.1 带芽茎段出苗诱导 截取软枣猕猴桃‘天源红’新发枝条上端 10 cm, 截成 3 cm 左右带芽茎段, 芽上下各 1.5 cm, 用洗洁精洗净, 在流水下冲洗 1~2 h; 在超净工作台上, 将茎段在 75% 酒精中消毒, 消毒后用无菌水冲洗 2 次, 置于 0.1% 升汞中消毒, 无菌水冲洗 4~5 次, 放在滤纸上, 将材料剪成 1 cm 左右带芽茎段 (芽下部茎稍长些) 供接种使用。

消毒后的茎段外植体分别接种于 5 种添加不同植物生长物质 (6-BA、IBA) 的 MS 培养基中, 每瓶放置 3 个茎段, 每个处理 10 瓶, 共 30 个重复, 观察发芽生长情况。

1.2.2 叶片、叶柄不定芽诱导 以新稍叶片为材料, 带回实验室经洗洁精洗净后, 流水冲洗 1~2 h; 在超净台中, 经酒精和升汞消毒后, 用无菌水冲洗 4~5 次, 放在滤纸上, 叶片横截叶脉剪成宽 0.2 cm 宽的细长条, 叶柄剪成 0.5 cm 长, 分别接种于 7 种添加不同植物生长物质 (6-BA、NAA、ZT) 的 MS 培养基中, 每个处理 6 瓶, 每瓶放置 5 片剪好的叶片或叶柄, 共 30 个重复, 观察愈伤形成、出芽生长情况。

1.2.3 不定芽增殖 经腋芽萌发和叶片、叶柄愈伤诱导产生的不定芽, 需进行增殖培养。将萌发后的幼嫩无菌苗 1~2 cm 转移到 6 种添加不同植物生长物质 (6-BA、IBA、NAA、ZT) 的 MS 培养基中, 每个处理 10 瓶, 每瓶 3 棵, 共 30 个重复, 培养 30 d 后观察不定芽的分化和生长情况, 计算增殖系数。

1.2.4 根的诱导 以 1/2 MS 培养基为基本培养基, 将诱导产生的 >2 cm 的不定芽接种于培养基中, 培养基共设计 4 种不同浓度的 IBA、NNA 组合, 每个浓度转入 10 瓶, 每瓶 3 棵已长好的不定芽, 共 30 个重复, 培养 30 d 后观察并记录生根情况。

1.2.5 炼苗与移栽 将生根后的组培瓶移入日光温室炼苗, 遮荫 3 d 不开瓶口, 拧松瓶口放置 1 d, 将瓶口

敞开 2 d,之后进行移栽,控制气温不超过 30 ℃,空气相对湿度在 90%以上。移栽所用基质为珍珠岩:泥炭:细沙=1:1:1,基质用多菌灵消毒晾干后备用。

2 结果与分析

2.1 不同植物生长物质对全红型软枣猕猴桃腋芽出芽的影响

在统计时排除外植体污染情况,单从萌芽率计算,‘天源红’茎段在不同浓度的植物生长物质中都有较高的萌芽率,接种后表型观察发现添加 NAA 的组合茎部愈伤产生较多,虽然观察到腋芽发芽,但苗伸长不好,不利于接种;6-BA 和 IBA 的组合萌芽率较高,特别在 6-BA 0.5 mg · L⁻¹+IBA 1.0 mg · L⁻¹浓度下,萌芽率可达到 100%(图版 I:1)。

表 1 不同植物生长物质组合对‘天源红’外植体腋芽出芽的影响

Table 1 Effects of different growth regulator substance on axillary bud germination in ‘Tianyuanhong’

植物生长物质组合 Growth regulator substance			外植体数 Number of explants	萌芽数 Number of bud	萌芽率 Bud percentage (%)
6-BA (mg · L ⁻¹)	IBA (mg · L ⁻¹)	NAA (mg · L ⁻¹)			
0.5	0.5	0	30	27	90
0.5	1.0	0	30	30	100
1.0	1.0	0	30	26	87
1.0	0	0.1	30	24	80
2.0	0	0.1	30	27	90

2.2 不同植物生长物质对全红型软枣猕猴桃叶片、叶柄愈伤组织诱导和不定芽形成的影响

叶片在诱导培养基中快速膨大生长,并且在靠近叶脉的位置易形成愈伤组织,但愈伤组织较为质密,而叶缘部位不容易有愈伤产生,尽管在每个组合中都有愈伤组织的产生,但出芽率较低,仅在 ZT 0.5 mg · L⁻¹时有的出芽率(图版 I:2,表 2),在 6-BA+NAA 的组合中,愈伤诱导率尚可,但出芽率也较低。

相对于叶片,叶柄更容易出芽,愈伤组织产生在叶柄两端,逐渐膨大出芽,在单加 ZT 的培养基中,随着 ZT 浓度增高,出芽率先增后减,ZT 为 0.5 mg · L⁻¹时,出芽率最高,ZT 浓度升高后形成的愈伤组织硬而质密,不适宜出芽增殖,添加 6-BA 和 NAA 组合

表 2 不同植物生长物质对‘天源红’叶片愈伤组织诱导和不定芽形成的影响

Table 2 Effects of different growth regulator substance on bud differentiation and callus inducing of leaf in ‘Tianyuanhong’

植物生长物质组合 Growth regulator substance			外植体数 Number of explants	愈伤组织 诱导率 Callus induction percentage (%)	出芽率 Germination percentage (%)
6-BA (mg · L ⁻¹)	ZT (mg · L ⁻¹)	NAA (mg · L ⁻¹)			
0	0.2	0	30	90	27
0	0.5	0	30	88	40
0	0.8	0	30	92	24
0	1.0	0	30	87	33
1.0	0	0.1	30	50	0
2.0	0	0.1	30	75	6
3.0	0	0.1	30	70	13

表 3 不同植物生长物质‘天源红’叶柄愈伤组织和不定芽形成的影响

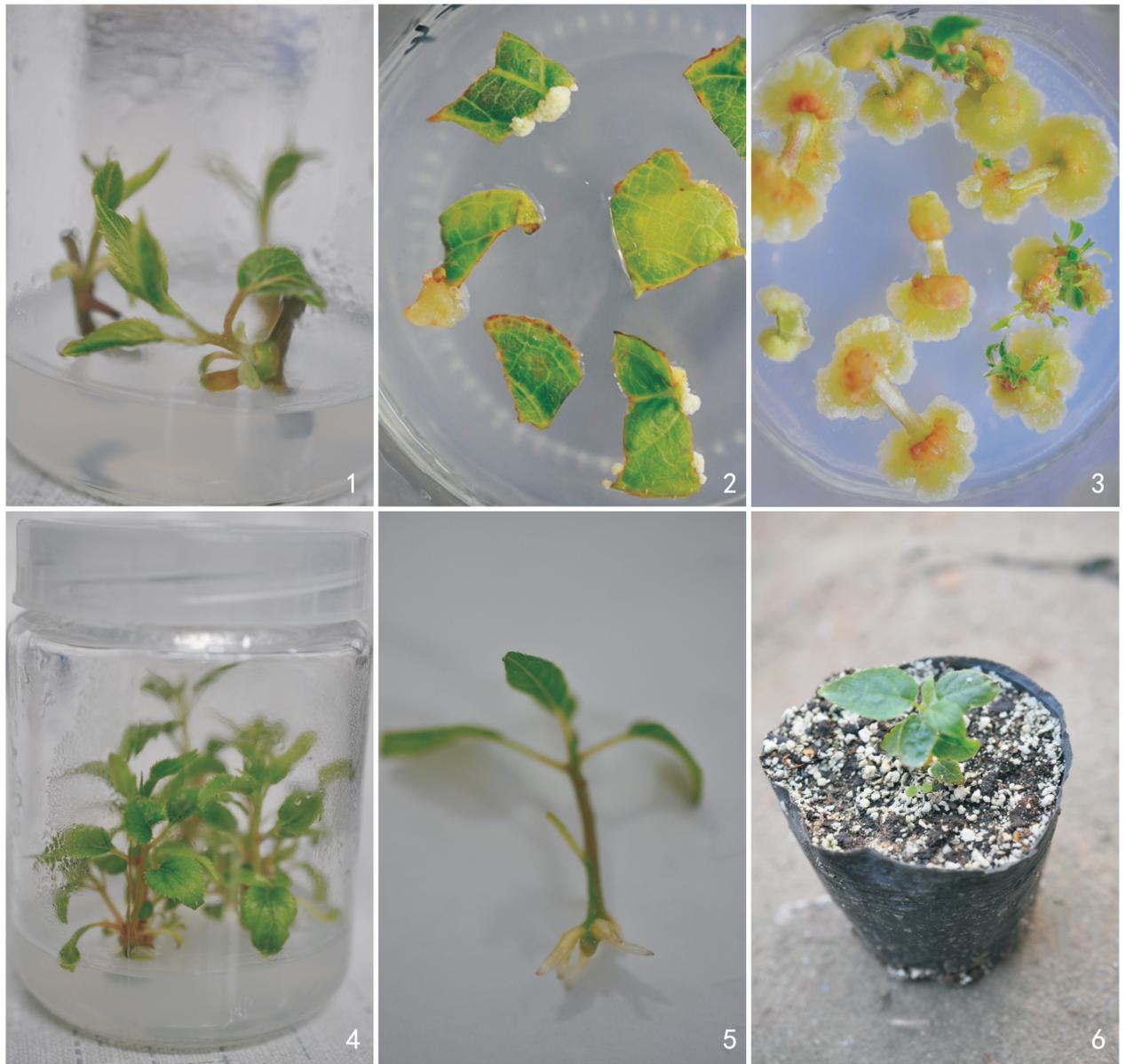
Table 3 Effects of different growth regulator substance on bud differentiation and callus inducing of leaf stem in ‘Tianyuanhong’

植物生长物质组合 Growth regulator substance			外植体数 Number of explants	愈伤组织 诱导率 Callus induction percentage (%)	出芽率 Germination percentage (%)
6-BA (mg · L ⁻¹)	ZT (mg · L ⁻¹)	NAA (mg · L ⁻¹)			
0	0.2	0	30	100	26
0	0.5	0	30	100	50
0	0.8	0	30	100	33
0	1.0	0	30	100	27
1.0	0	0.1	30	100	6
2.0	0	0.1	30	100	27
3.0	0	0.1	30	100	33

后,也会诱导形成愈伤组织,但出芽率如表 3 所示没有加 ZT 效果好(图版 I:3,表 3)。

2.3 不同植物生长物质组合对不定芽增殖的影响

单株小苗接种于不同增殖培养基中培养,发现在添加 ZT 的培养基中,培养后 10 d 左右开始出芽,在 30 d 后可长成 > 2 cm 的高度,在 ZT 为 1.0 mg · L⁻¹时增殖率最大(图版 I:4),并且提高 ZT 浓度也没有增大



图版 I ‘天源红’茎段出芽及叶片再生体系 1. 茎段腋芽; 2. 叶片愈伤; 3. 叶柄愈伤; 4. 丛生芽; 5. 生根; 6. 移栽。

Plate I Establishment of stem budding and regeneration of leaf in ‘Tianyuanhong’ 1. Stem with axillary bud;

2. Callus of leaf; 3. Callus of leaf stem; 4. Multiple shoot clumps; 5. Shooting; 6. Transplant.

增殖率,我们发现在添加高浓度 6-BA 时,小苗同样有增殖的效果,但是 6-BA 的浓度过高时,茎段基部愈伤组织会加速膨大,并且愈伤质密不利于出苗。

2.4 不同生根培养基对幼苗生根的影响

将长 2.0 cm 左右的单棵苗转移到 1/2 MS 培养基中,添加不同浓度的 IBA 和 NAA,观察生根时发现有两种生根方式,一种是茎部先形成疏松的愈伤组织,愈伤组织发出根;另一种是茎部直接发出根,这种生根方式更有助于提高移栽成活率。从表 5 可以看出,在 NAA 0.2 mg · L⁻¹ 时生根率最高,并且主

要以茎部发根为主。

2.5 生根苗移栽研究

生根苗移栽在配好的基质中,经过 30 d,成活率可达到 98% 以上,根系生长旺盛,可以进行大田栽种(图版 I :5、图版 I :6)。

3 讨论与结论

本研究采取两种途径获得‘天源红’猕猴桃无菌苗的方法,其中带芽茎段直接出苗的方法可以较

表 4 不同植物生长物质组合对‘天源红’不定芽增殖的影响
Table 4 Effects of different growth regulator substances on adventitious propagation in ‘Tianyuanhong’

植物生长调节剂组合 Growth regulator substance			植株数 Number of plants	增殖系数 Regeneration coefficient
ZT ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	6-BA ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	IBA ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)		
0.5	0	0	30	3.0
1.0	0	0	30	4.5
2.0	0	0	30	4.5
0	1.0	0.5	30	2.0
0	2.0	0.5	30	3.5
0	3.0	0.5	30	2.0

表 5 不同植物生长物质组合对‘天源红’幼苗生根的影响
Table 5 Effects of different growth regulator substances on rooting in ‘Tianyuanhong’

IBA ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	NAA ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	总株数 Total plants	生根株数 Number of rooting	生根率 Rooting rate (%)
0.7	0	80	59	84
1.0	0	82	69	74
0	0.2	55	53	96
0	0.5	47	40	85

快地获得无菌苗;在叶片和叶柄通过愈伤组织出芽的方式中,叶柄的愈伤诱导率和出芽率都较高,而叶片的相对较低;虽然通过愈伤获得苗的方法不如腋芽出苗快捷,但通过愈伤组织建立的再生体系可以为今后的遗传转化研究以及染色体倍性操作相关研究提供基础。本研究获得最佳腋芽增殖培养基为 $\text{MS}+6\text{-BA } 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{IBA } 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$;叶柄愈伤诱导培养基为 $\text{MS} + \text{ZT } 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$;增殖培养基为 $\text{MS} + \text{ZT } 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$;生根培养基为 $1/2\text{MS} + \text{NAA } 0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

在进行不定芽增殖时,采用腋芽出苗的方法获得的无菌苗在遗传上性状更加稳定,能够保持品种的优良性状(刘翠云等,1996)。本研究中也发现采用带芽茎段能够快速获得无菌苗。关于软枣猕猴桃愈伤诱导,前人的研究结果不一致,张远记等(1996)指出茎段容易愈伤化,但愈伤组织难以分化,叶片不易愈伤化,但愈伤组织容易分化;贾景明等(1999)以幼茎作为外植体愈伤组织诱导率可达

75%;本研究发现采用叶柄能够很好地获得愈伤组织并能够进一步分化,叶柄两侧伤口处有膨大愈伤组织产生,这与郑小华(2008)的研究一致。

关于猕猴桃愈伤组织诱导,目前认为 ZT 的使用效果最好(张远记等 1996;谢志兵和鲁旭东,2003),近年来的研究发现高浓度的 6-BA 可替代 ZT 诱导出芽,也有认为适当浓度的 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(刘峥等,2013)。本研究发现在‘天源红’的增殖过程中,可以采用 6-BA 来代替 ZT,可获得同样的增殖效果,没有对茎的伸长生长造成影响,也可能是由于软枣猕猴桃本身的长势较好;在腋芽快速出芽时也可采用 6-BA 代替 ZT,但是愈伤诱导时,还没有发现合适的 6-BA 的浓度配比能够诱导出芽,因此,在愈伤诱导时在培养基中加入 ZT 还是快速的出芽诱导的方法。

猕猴桃组织培养是进行猕猴桃生理生化研究和遗传转化研究的重要基础。中华猕猴桃、美味猕猴桃、软枣猕猴桃、葛枣猕猴桃、大籽猕猴桃、阔叶猕猴桃、毛花猕猴桃都有相关的组织培养的报道(秦永华等,2004),其中研究较深入的中华猕猴桃“红阳”已建立再生体系并导入抗病基因(周月等,2013),绿肉软枣猕猴桃原生质体培养并有 GFP 基因转化的研究(朱道圩,1997;朱道圩等,2003)。但是相关全红型软枣猕猴桃组织培养还未有报道,全红型软枣猕猴桃作为新的新品种,具有很好的市场前景,同时由于其果肉全红的特色,也是遗传研究的较好材料。本研究的进行,丰富了猕猴桃品种的离体再生体系,为猕猴桃新品种苗木快繁以及今后的研究中进行遗传转化研究提供条件。

参考文献:

- HUANG HW, GONG JJ, WANG SM, et al, 2000. Genetic diversity in the genus *Actinidia* [J]. *Biol Sci*, 8 (1): 1-12. [黄宏文, 龚俊杰, 王圣梅, 等, 2000. 猕猴桃属 (*Actinidia*) 植物的遗传多样性 [J]. *生物多样性*, 8 (1): 1-12.]
- HUH, ZHANG ZD, 2011. The study of tissue culture and micro propagaton in *Actinidia arguta* ‘Kuiv’ [J]. *Jinlin Agric*, 252 (2): 71-72. [胡皓, 张志东, 2011. 软枣猕猴桃‘魁绿’品种组培微繁技术研究 [J]. *吉林农业*, 252(2): 71-72.]
- JIA JM, MA CY, ZHENG G, 1999. The regenerated plant gained from somatic cell culture of *Actinidia arguta* [J]. *J Shenyang Norm Univ (Nat Sci Ed)*, (4): 63-65. [贾景明, 马纯艳, 郑国, 1999. 软枣猕猴桃体细胞培养获得再生植株 [J]. *沈阳师范学院学报(自然科学版)*, (4): 63-65.]

(下转第 1302 页 Continue on page 1302)