

猕猴桃实生苗再生体系的建立

周玲艳^{1,2}, 秦华明³, 赖幸韵¹, 陈楚欢¹, 梁 红^{1*}

(1. 仲恺农业工程学院 生命科学院, 广州 510225; 2. 华南农业大学生命
科学学院, 广州 510624; 3. 暨南大学理工学院, 广州 510623)

摘 要: 以成熟饱满的美味猕猴桃种子发芽获得实生苗, 分别以实生苗的茎段、叶柄和叶片为材料建立了再生体系。结果表明: 种子以 2.5 mg/L 的赤霉素(GA3)处理 8 h 较适合; 以培养基发芽较为适合; 茎段、叶柄和叶片的愈伤组织的诱导率均为 100%, 且茎段、叶柄比叶片容易脱分化, 但叶片的平均出苗率最高。再生苗在移栽 5d 后, 开始长出新叶, 10 d 后就能完全适应外界环境。

关键词: 猕猴桃; 实生苗; 外植体; 再生体系

中图分类号: Q943.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2009)04-0514-04

Establishment of regeneration system of kiwifruit seedlings

ZHOU Ling-Yan^{1,2}, QIN Hua-Ming³, LAI Xing-Yun¹,
CHEN Chu-Huan¹, LIANG Hong^{1*}

(1. College of Life Science, Zhongkai Agriculture and Engineering University, Guangzhou 510225, China;

2. College of Life Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China;

3. College of Science and Technology, Jinan University, Guangzhou, 510632, China)

Abstract: The full and mature seeds of kiwifruit were germinated to obtain the seedlings, and the regeneration system was established by using the stems, petioles and leaves as explants. The results showed that: the concentration of GA3 which was appropriate to treat the seeds was 2.5 mg/L and the treatment time was 8 h; the medium was more suitable for seed germination; the stems and petioles was easier to dedifferentiation than leaves, however, the average emergence rate of leaves was the highest.

Key words: kiwifruit; seedling; explants; regeneration system

现今, 植物组织培养技术已逐步完善, 但木本植物的组培育苗难度仍较大, 常易出现褐化和玻璃苗等现象, 组培苗后期的生根也有困难, 至今木本植物组培育苗的成功率仍明显低于草本植物(阳小成等, 2002)。

系统研究猕猴桃组织培养的方法, 具有重要的实际意义。首先, 植株再生体系的建立为使用基因工程方法改进猕猴桃品质奠定重要基础; 其次, 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。本文以成熟饱满的猕猴桃种子萌发所得的实生苗为材料, 对猕猴桃再生体系进行了初步研究。

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 将种子用清水洗净后, 用 2.5

收稿日期: 2007-09-13 修回日期: 2008-04-25

基金项目: 广东省科技计划项目(2005B60301010); 仲恺农业工程学院校基金(G3051312)[Supported by Science and Technology Project of Guangdong Province(2005B60301010); Fund of Zhongkai Agriculture and Engineering University(G3051312)]

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

* 通讯作者(Author for correspondence, E-mail: lhofice@yahoo.com.cn)

mg/L 的赤霉素(纯度为 90%，配置时以少量 95%乙醇助溶)溶液分别浸泡 5、8、15、20、24 h 以打破种子休眠，然后以 2% 的次氯酸钠消毒 15 min，灭菌水冲洗 3~5 次，将种子用镊子分别接种于 MS 基本培养基和带湿润滤纸的灭菌培养皿中，并定期加无菌水以保持滤纸的湿润，统计种子的发芽势和发芽率。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 不定芽的诱导 待小植株长至大约 8 cm 高时，切取其叶片、叶柄和不带腋芽的茎段分别接入不定芽诱导培养基中，叶片切块约为 0.5 cm×0.5 cm，叶柄和茎段长约 0.5 cm。每瓶约含 4 块外植体，每种外植体各约 10 瓶。26℃，每天光照 12 h，定期观察外植体愈伤组织和不定芽诱导情况。

1.2.3 生根、驯化与移栽 将不定芽苗丛用解剖刀一棵棵分开来，并转移到生根培养基上，每瓶约含 5 棵苗，小苗生根培养约 70 d 后，根系发达，此时对广口瓶内的苗进行炼苗，每天逐渐增加开盖时间，到炼苗第 7 天时，洗净小苗根上的培养基，种植在细沙盆中，置于靠窗边的培养架上，每天浇水一次以保持沙土湿润。

表 1 赤霉素浸种时间及发芽方式对种子发芽率的影响
Table 1 Effect of immersion time with GA3 and the germinating condition on the rate of germination

赤霉素处理时间 Treatment time of GA3 (h)	发芽率 Germination rate (%)	
	滤纸 Filter paper	培养基 Medium
5	70.5	40.9
8	91.7	71.4
15	50	48.6
20	49.8	49
24	52.3	53.9

2 结果与分析

2.1 赤霉素浸种时间及发芽方式对种子发芽的影响

表 1 和图 1、2 的结果表明，赤霉素浸泡种子以 8 h 为宜，其中，滤纸和培养基的发芽率分别为 91.7% 和 71.4%。两种发芽方式的发芽率差异受赤霉素浸种时间的影响，尽管两者最大发芽率均以浸种 8 h 为宜，但浸种时间小于 8 h 时，培养基上的种子发芽率明显低于滤纸上的，而当浸种时间延长至 15 h 时，两者的发芽率相差不大，均在 50% 左右。另外，滤纸上的种子萌芽较快，1 周左右破芽萌发，10 d 左右露出子叶，而培养基上的种子萌发较慢，

一般要 10 d 以后才破芽萌发，但培养基上的小苗后期生长较快，且培养基发芽不需要定期加水，从而减少了污染，所以在种子充足的情况下，选择培养基发芽方式可减轻工作量。



图 1 猕猴桃种子培养基上发芽情况
Fig. 1 The germination of seeds on medium



图 2 猕猴桃实生苗生根情况
Fig. 2 The root of seedling

表 2 不同外植体的培养效果
Table 2 Condition of differentnt explants in culture

外植体类型 Explants type	外植体数 No. of explants	愈伤组织诱 导率 (%) Iduction rate of calli	不定芽分 化率 (%) Dfferentiation rate of adven- titious bud	平均芽数 Aerage No. of adve- ntitious bud
茎段 Stem	44	100	100	10.32
叶柄 Petiole	36	100	100	11.11
叶片 Leaf blade	32	100	100	15

2.2 不同外植体的不定芽诱导

表 2 和图 3、4 的结果表明，茎段的愈伤组织起始最早，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，外植体膨大至原来 3~4 倍，部分位置开始分化形成绿点，进一步分化形成小苗。而叶柄切段接种在基本培养基上，经 3 d 培养，外植体切口处开始膨大外凸，1 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。2 周后，愈伤组织上出现多个白色芽点，进一步形成不定芽，且叶柄愈伤组织化程度也比较高。叶片接种后继续伸长增大至大约原来体积的 2 倍，10~15 d 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,叶脉和叶片表面也有少量愈伤组织形成,且从愈伤组织处出现绿点,并很快形成不定芽,此时部分叶片还没有完全愈伤化,有时叶片未愈伤组织化处也分化形成芽丛,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,后期不定芽分化的速率非常快,有时一个叶片外植体分化形成芽丛多时达到40~50个小苗。三种外植体的愈伤组织诱导率和不定芽分化率都达到100%,平均出芽数均在10以上,但以叶片外植体的平均出芽率为最高。

2.3 生根培养

植入生根培养基上的再生苗经过几天的生长停滞期后,植株开始缓慢生长。再生苗移入生根培养

基十天左右开始长出幼根,然后主要表现为主根深入培养基,并长出侧根,侧根上长出大量根毛;生根培养基培养35 d左右,根生长较为完善,植株主要向上生长并长出新叶;植株经过70 d培养后生长情况良好,根系完整,在培养基内部交叉生长,叶片不断增大。幼苗的最高株高约有12 cm,每植株约有5~8片叶。

2.4 驯化与移栽

幼苗在广口瓶内驯化时,叶面容易出现皱缩;幼苗植入沙粒后,幼苗上的叶片继续出现萎焉和脱落的现象,有几株较为弱小的幼苗死亡。5 d后,幼苗叶片的萎焉和脱落情况好转,开始长出新叶。幼苗移栽入沙粒后10 d,幼苗基本上适应新环境,植株继续长高和长出新叶。第15天将较大的植株移入沙粒较多的花盆内继续种植。如图5所示。

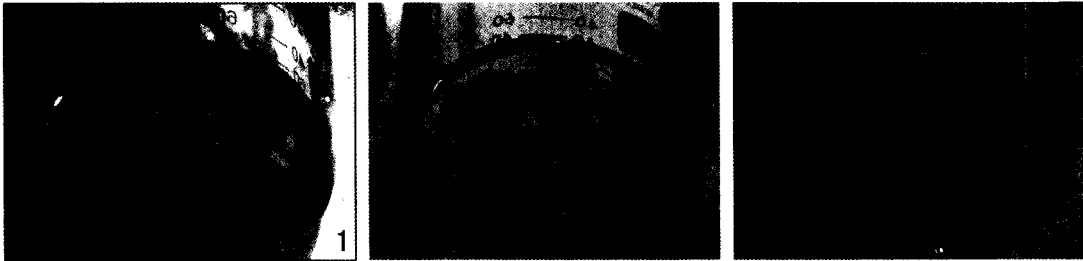


图3 不同外植体愈伤组织诱导情况(1:茎段;2:叶柄;3:叶片)
Fig. 3 The callus induction of different explants (1:stem; 2:petiole; 3:leaf blade)

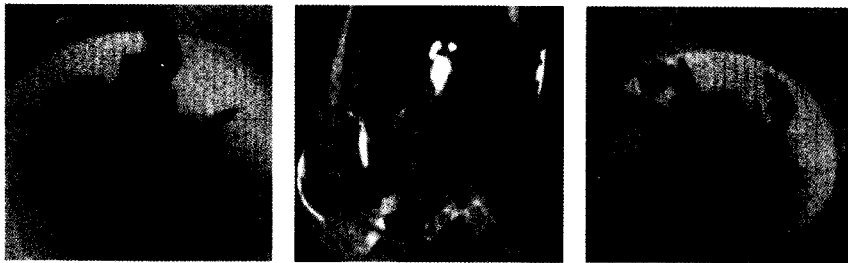


图4 不同外植体不定芽分化情况(1:茎段;2:叶柄;3:叶片)
Fig. 4 The adventitious bud differentiation of different explants (1:stem; 2:petiole; 3:leaf blade)

3 讨论

猕猴桃种子采集后有一个休眠期,播种前常用沙藏或赤霉素处理。GA₃能破除芽及种子的休眠,促进萌发,用GA₃处理可代替低温层积处理,使种子萌发。本实验发现以GA₃浸种一定时间可以促进种子发芽,浸种时间以8 h为最佳。而朱道圩等

(2005)认为赤霉素浸种5 h和24 h的破眠效果相同,种子发芽率均达95%以上。这可能与赤霉素的纯度以及不同品种的猕猴桃种子有关。本实验还发现滤纸上发芽的种子萌芽相对较快,这可能是由于种子萌发初期需要大量吸水有关,湿润滤纸水分提供充分,故种子破芽萌发较快,但随着种子的萌发和幼苗的生长,胚乳营养物质逐渐耗尽,滤纸上的水分已经完全不能满足幼苗生长的营养需要,所以在幼

苗生长后期, 滤纸上的小苗生长较慢, 而培养基上的幼苗反而生长较快。

本试验发现叶柄、茎段比叶片容易脱分化, 已有不少研究者(姜长阳等, 2003; 余小林等, 2004; 曾建军等, 2006)报道了不同外植体的脱分化和再分化存

在较大差异, 这可能与不同外植体中细胞的分化程度不同以及内源激素水平不同有关。本实验在叶片的培养中发现, 愈伤组织大多数首先在叶脉和叶缘的切口处产生, Mushtaq 等(1997)也报道了类似现象, 认为可能是外植体边缘容易从培养基中吸收有

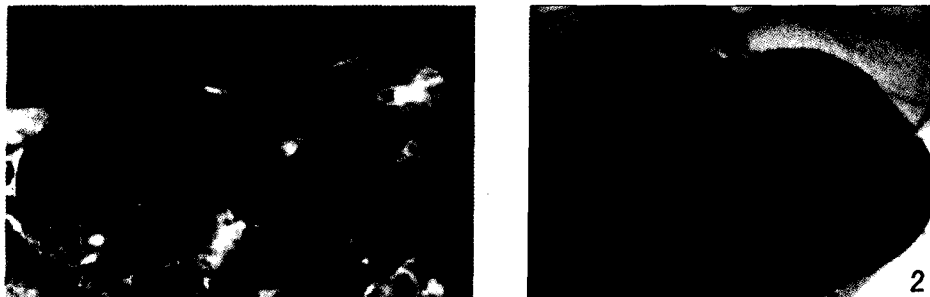


图 5 再生苗移栽后的情况 (1: 幼苗移栽 5 d; 2: 幼苗移栽 70 d)

Fig. 5 The transplanting of regenerated plants (1: 5 d after transplanting; 2: 70 d after transplanting)

效的营养和激素所导致; 本实验还发现, 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, 这与 Nabila & Mohammad(2000)的报道一致。在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。

试管苗的移栽是再生体系建立最后的关键。本实验中发现再生植株在移栽后的前几天, 叶片出现萎焉和脱落, 但几天后重新发出芽来, 罗成科等(2007)在半夏再生苗的移栽中也发生类似情况。丁士林等(1997)认为闭瓶强光锻炼, 使试管苗从以异养为主逐步过渡到以自养为主, 同时认为创造适宜的移栽条件也是非常重要的, 如气温不过 30℃, 相对空气湿度在 90% 以上等。汪建亚等(1998)认为试管苗成活的关键在于移栽后较高的湿度和良好的通风条件。本试验采用的沙粒疏水性比较好, 但保水性较差, 根据这一点, 每天浇水两到三次, 保证基质湿润, 并以保鲜膜搭成小棚, 棚内放置 2 个装满水的烧杯, 以保持空气的湿度, 提高移栽成活率。移栽前还应将再生苗根部的培养基洗除干净, 但同时应注意保持根的完整性以保证小苗的成活率。

参考文献:

- Ding SL(丁士林), Zhu XZ(朱秀珍), Yu HM(余厚敏). 1997. The culture of *Actinidia deliciosa* (美味猕猴桃的组织培养)[J]. *Chinese Fruit* (中国果树), (2): 27—29
- Jiang CY(姜长阳), Ning SX(宁淑香), Yu M(于森), et al. 2003. A high efficient plant regeneration system from callus of *Pteridium apuilingum* (蕨菜愈伤组织高效再生体系的建立)[J]. *Acta Hort Sin* (园艺学报), 30(3): 343—345
- Luo CK(罗成科), Peng ZS(彭正松), Cai P(蔡鹏), et al. 2007. *In vitro* regeneration of *Pinellia ternate* from leaf explant (三叶半夏叶片一步成苗离体培养技术)[J]. *Guihaia* (广西植物), 27(2): 260—264
- Mushtaq S, Skirvin RM. 1997. Effect of thidiazuron and 6-benzylaminopurine on adventitious shoot regeneration from leaves of three strains of "McIntosh" apple (*Malus × Domestica*) *in vitro* [J]. *Sci Hort*, 68: 95—100
- Nabila SK, Mohammad AM. 2000. Direct shoot regeneration and microtuberization in wild *Cyclamen persicum* using seedling tissue[J]. *Sci Hort*, 86: 235—246
- Wang JY(汪建亚), Kounou Kouzou(河野耕藏). 1998. Research on tissue culture and reproductive capacity of *Actinidia chinensis* (猕猴桃的组织培养及繁殖能力的研究)[J]. *Fore Res* (林业科学研究), 11(6): 635—639
- Yang XC(阳小成), Wang BC(王伯初), Ye ZY(叶志义), et al. 2002. Tissue culture and rapid propagation of *Actinidia chinensis* (中华猕猴桃的组织培养及其实用快速繁殖)[J]. *J Chongqing Univ* (Nat Sci Edi) (重庆大学学报·自然科学版), 25(6): 75—77
- Yu XL(余小林), Cao Js(曹家树), Chen St(陈石头), et al. 2004. Improvement of plant regeneration from mustard cultures *in vitro* (提高榨菜离体培养植株再生频率)[J]. *Chin J Cell Biol* (细胞生物学杂志), 26: 439—443
- ZENG JJ(曾建军), Xiao YA(肖宜安), Sun M(孙敏), et al. 2006. Callus induction and plant regeneration of *Disanthus cercidifolius* var. *longipes* 长柄双花木愈伤组织诱导及植株再生[J]. *Guihaia* (广西植物), 26(6): 628—630
- Zhu DY(朱道圩), Wang JY(王静毅), Lu ZQ(吕宗强). 2005. Establishment of tissue culture system for raising kiwifruit seedling (猕猴桃实生苗组织培养体系建立的研究)[J]. *Deciduous Fruits* (落叶果树), (2): 5—7