



红阳猕猴桃带芽茎段再生体系的建立

张茜,李明章,王丽华,杜奎,刘鑫,樊高敏

(四川省自然资源科学研究院,四川 成都 610015)

摘要:为建立红阳猕猴桃快速繁育高效再生体系,以带芽茎段为外植体材料,通过诱导带芽茎段直接出芽,研究不同浓度激素的MS培养基对腋芽萌发、不定芽增殖及生根的影响。结果表明:最适宜带芽茎段腋芽萌发的培养基是MS+1.0 mg·L⁻¹ 6-BA+0.1 mg·L⁻¹ NAA,萌芽率达88.37%。在MS+1 mg·L⁻¹ ZT+0.1 mg·L⁻¹ NAA培养基上,不定芽增殖效果最好。1/2MS+0.8 mg·L⁻¹ IBA培养基最利于不定芽诱导生根,根系发达,再生苗长势健壮。

关键词:红阳猕猴桃;组织培养;带芽茎段

猕猴桃(*Actinidia* Lindl.)是多年生藤本果树,原产于中国,主要经济栽培品种有中华猕猴桃(*Actinidia chinensis*)和美味猕猴桃(*Actinidia deliciosa*)以及少量的软枣猕猴桃(*Actinidia arguta*)和毛花猕猴桃(*Actinidia eriantha*)^[1]。红阳猕猴桃从中华猕猴桃自然实生种群中筛选培育出的优良红肉猕猴桃品种,其果心横切面呈放射状红色条纹,红色性状遗传稳定,口感细腻,营养丰富,十分具有市场推广价值^[2-4]。植物组织培养技术已广泛应用在各个科学领域,组织培养技术在猕猴桃新品种培育和种性改良中有着巨大的潜力,与种子实生繁殖、扦插、嫁接等传统育苗方式相比,具有育种周期短,后代性状稳定,劳动成本低,繁殖率高等优点^[5]。因此,进行猕猴桃组培快繁育苗,具有非常广阔的市场。

本试验以红阳猕猴桃的带芽茎段为外植体材料,在附加不同种类和浓度植物生长调节剂的MS培养基上培养,通过带芽茎段直接诱导萌芽,不定芽增殖与生根,筛选各阶段最佳培养基,建立红阳猕猴桃高效再生体系,缩短猕猴桃繁育周期,提高出苗率,为红阳猕猴桃组培工厂化育苗和遗传转化提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 材料

于2016年在四川省自然资源科学研究院什邡猕猴桃基地,取多年生红阳猕猴桃(*Actinidia chinensis* cv. Hongyang)春梢上的带腋芽茎段为外植体材料。

试验中的MS培养基、植物生长调节剂(6-BA、NAA、ZT、IBA、GA₃)均购自PhytoTech公司;琼脂粉、蔗糖、氢氧化钠、盐酸等生化试剂购自科龙试剂公司,均为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 外植体处理 用流动自来水冲洗掉带芽茎段表面尘土,清洗时无需刷掉表面茸毛,以免形成伤口,造成褐化。在超净工作台上,将预处理过的长茎段切成带一个芽长约1~2 cm的小段作为带芽茎段外植体。将带芽茎段置于超净工作台,在无菌瓶中用75%酒精表面消毒30 s,无菌水清洗2遍,再用5%的次氯酸钠溶液处理15 min,无菌水清洗6次,灭菌及清洗过程可不断振荡玻璃瓶,以保证灭菌充分。

1.2.2 培养基 以MS为基本培养基,附加30 g·L⁻¹蔗糖、7.5 g·L⁻¹琼脂,根据不同试验目的加入不同种类和浓度的植物生长调节剂(NAA、6-BA、GA₃、IAA等),用1 mol·L⁻¹的NaOH和HCL溶液调节pH至5.8,培养基在高温高压灭菌(121℃,20 min)后备用。

1.2.3 不定芽的诱导 将消毒灭菌处理过的带芽茎段以腋芽朝上形式,竖插接种到附加不同生长调节剂组合的不定芽诱导培养基上,带芽茎段直接诱导腋芽萌发。每个处理接种20个外植体,重复3次。置于温度(25±1)℃,相对湿度70%,

收稿日期:2017-11-13

基金项目:四川省科技厅国合资助项目(2015HH0038);四川省“十三五”农作物及畜禽育种攻关资助项目(2016NYZ0034);四川省中央引导地方科技发展专项资金资助项目(2016TZYD0001);四川省科技支撑计划资助项目(2016NZ0105)。

第一作者简介:张茜(1990-),女,硕士,研究实习员,从事猕猴桃资源保存与育种研究。E-mail:zqxabc@126.com。

通讯作者:王丽华(1978-),女,硕士,副研究员,从事猕猴桃资源保存与育种研究。E-mail:514935456@qq.com。

光照强度 2 000 lx(光照/黑暗=16 h/8 h)条件下培养。30 d 后观察出芽情况。统计带芽茎段的萌芽率(%)=腋芽萌发的外植体数/接种外植体总数 $\times 100$,褐化率(%)=褐化外植体数/接种外植体总数 $\times 100$ 。筛选出最适不定芽诱导培养基。

1.2.4 继代增殖 将初代培养获得的芽苗接种到附加不同生长调节剂组合的增殖培养基中,每个处理接种 20 个芽苗,重复 3 次,每 30 d 继代 1 次,培养 30 d 后观察不定芽生长情况,统计增殖率(增殖率=发生增殖的芽数/接种芽数),不定芽增殖系数(增殖系数=增殖芽总数/发生增殖的芽数),筛选出最适不定芽继代增殖培养基。

1.2.5 生根培养 当组培苗长至 4~5 cm 时,切除基部愈伤组织,接种到以 1/2MS 为基本培养基附加不同浓度 IBA 的生根培养基中。培养 30 d 后,观察不定芽的生根部位,统计生根率(%)=生根芽数/接种芽数 $\times 100$ 、平均根数=总根数/生根苗数、平均根长=根总长/根总条数,筛选出最适生根培养基。

1.2.6 组培苗移栽与炼苗 为使组培苗适应外界环境,将已生根的生长健壮的组培苗置于温室(温度 25℃左右,湿度 80%)中炼苗,将组培瓶盖松开但不揭开,7 d 后取出组培苗,用清水洗净植株根部的培养基,移栽到装有无菌基质(蛭石 25%+珍珠岩 25%+河沙 20%+大田土 30%)营养钵中,置于温室大棚中,期间保持良好透水

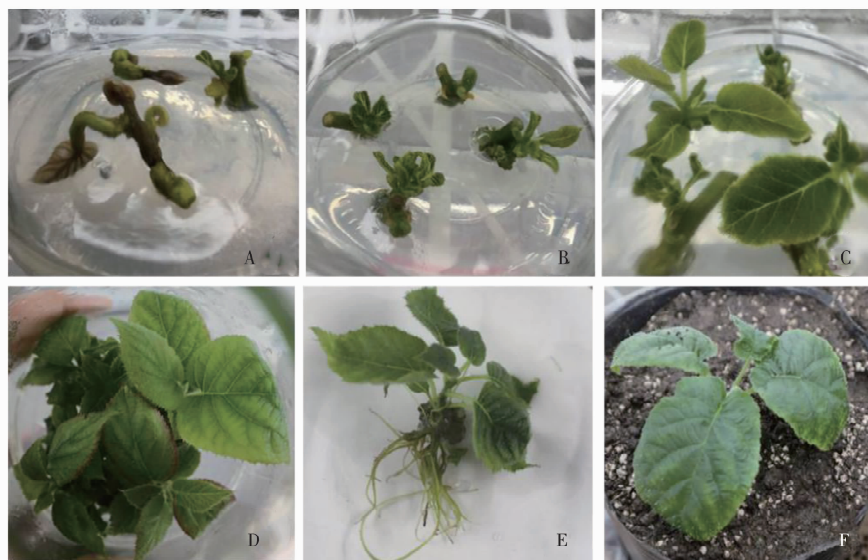
性,精心管理,15 d 后统计幼苗移栽成活率。

1.2.7 数据分析 采用 Excel 2010 进行数据处理。

2 结果与分析

2.1 不同植物生长调节剂对带芽茎段腋芽萌发的影响

不同外植体诱导不定芽产生所需的植物生长调节剂种类及用量不同。本试验以红阳猕猴桃带芽茎段为外植体,通过调节 6-BA 和 NAA 浓度诱导腋芽萌发,统计萌芽率和褐化率,结果如表 1 所示。试验过程发现,带芽茎段接种 2 d 后,基部周围培养基变为褐色,培养 7 d 后褐化严重,部分带芽茎段褐化萎蔫,各培养基间褐化率差异不显著(图 1A)。14 d 后,有部分褐化萎蔫的带芽茎段在腋芽位置有芽萌发,萌发出芽的茎段褐化现象减缓,茎段逐渐转绿,再生芽也未出现褐化现象(图 1B)。继续培养,萌发腋芽的叶片生长迅速,叶面积增大,茎段褐化现象基本消失,茎段基部均有绿色愈伤组织产生(图 1C)。由表 1 可知,在一定范围内(0.5~1.0 mg \cdot L⁻¹),随着 6-BA 浓度的增加,腋芽萌芽率增加,同等 6-BA 水平下,适当提高 NAA 浓度对腋芽褐化有一定抑制作用。综合萌芽率和褐化率,MS+1.0 mg \cdot L⁻¹ 6-BA+0.1 mg \cdot L⁻¹ NAA 最适宜带芽茎段萌芽,萌芽率达 88.37%。



A:带芽茎段褐化; B~C:带芽茎段萌芽; D:不定芽增殖; E:不定芽生根; F:组培苗移栽成活。

A:Axillary bud browning; B~C:Axillary bud sprouting; D:Adventitious bud multiplication; E:Adventitious bud rooting; F:The tissue culture plantlets survival.

图 1 红阳猕猴桃再生体系

Fig. 1 Regeneration system of Hongyang kiwifruit

表 1 不同植物生长调节剂对带芽茎
段腋芽萌发的影响

Table 1 Effects of different plant growth
regulators concentration on sprouting
of axillary bud

编号 Number	6-BA/ mg·L ⁻¹	NAA/ mg·L ⁻¹	萌芽率/% Germination rates	褐化率/% Browning rates
A1	0.5	0.1	33.81	87.50
A2	1.0	0.1	88.37	67.89
A3	2.0	0.1	82.50	76.33
A4	0.5	0.3	49.55	78.43
A5	1.0	0.3	67.50	64.82
A6	2.0	0.3	59.09	73.58

2.2 不同植物生长调节剂对不定芽继代增殖的影响

由表 2 可知,不定芽接种到不同增殖培养基中,14 d 左右开始增殖,增殖率 81.25%~95.83%,说明大部分不定芽都能增殖。经过连续 3 次继代培养,B2 与 B5 号培养基都可以促使不定芽快速增殖,增殖系数均高于 3.8,但是 B2 号

表 2 不同植物生长调节剂对不定芽继代增殖的影响

Table 2 Effects of different plant growth regulators concentration on bud multiplication

编号 Number	浓度/(mg·L ⁻¹) Concentration				增殖率/% Multiplication rate	增殖系数 Multiplication factor	生长情况 Growth vigor
	6-BA	ZT	NAA	GA ₃			
B1	2	0	0.1	0.1	81.25	2.15	增殖较快,芽丛生,呈针状
B2	2	0	0.2	0.1	93.75	3.84	增殖快,玻璃化,芽苗不健壮,叶片部分卷曲或狭长
B3	2	0	0.5	0.1	83.33	2.63	增殖慢,玻璃化,基部愈伤膨大
B4	3	0	1.0	0	91.67	3.30	增殖慢,玻璃化,基部愈伤膨大,部分须根
B5	0	1	0.1	0	95.83	3.87	增殖快,芽健壮,生长旺盛,根少许

表 3 不同 IBA 浓度对不定芽生根的影响

Table 3 Effects of different IBA
concentrations on rooting

编号 Number	IBA/ (mg·L ⁻¹)	生根率/% Rooting rate	平均根数/条 Average root number	平均根长/cm Average root length
C1	0	20.83	2.30	1.87
C2	0.4	54.17	3.00	2.12
C3	0.6	66.67	3.66	3.62
C4	0.8	77.08	4.16	4.18
C5	1.0	70.83	3.94	3.54

培养基增殖的不定芽在继代后出现玻璃化现象,致使芽苗畸形不健壮,B5 号培养基增殖的芽苗健壮,长势好(图 1D)。综上,最适合不定芽增殖和继代的培养基是 MS+1.0 mg·L⁻¹ ZT+0.1 mg·L⁻¹ NAA。

2.3 不同 IBA 浓度对不定芽生根的影响

以 1/2MS 培养基为基本培养基,添加不同浓度生长素类调节剂 IBA,不定芽接种到生根培养基上,培养 30 d 后统计生根情况,结果如表 3 所示,含生长素的生根培养基中的组培苗在接种后 7 d,幼苗茎基部有愈伤组织产生,愈伤组织继续培养再分化出根。在无激素的 1/2MS 培养基中也有根产生,但需较长时间,说明适当的生长调节剂对组培苗生根有促进作用。随着生长素 IBA 浓度的增加,愈伤组织大小、生根率、平均根数和根长均逐渐增长,当 IBA 浓度为 0.8 mg·L⁻¹ 时,组培苗生根率最高,平均根数与根长也较高,且根部有分支,有利于营养吸收(图 1-E),之后随着浓度继续升高各项指标均呈现降低趋势。综合说明,红阳猕猴桃最佳生根培养基是 1/2MS+0.8 mg·L⁻¹ IBA。

2.4 组培苗的移栽

将长势较好的组培苗先置于温室内揭膜炼苗 7 d,再移栽到营养基质中,14 d 后,组培苗移栽成活率达到 90%以上(图 1F)。移栽前几日幼苗根部或有杂菌滋生,但对移栽影响不大,成活后幼苗日益健壮。

3 讨论与结论

近年来,猕猴桃组织培养已经取得较大进展,研究不仅涉及中华猕猴桃和美味猕猴桃,软枣猕猴桃、葛枣猕猴桃、阔叶猕猴桃、狗枣猕猴桃等种类资源都有报道^[6-9]。不同猕猴桃种类资源和不同

同外植体材料的再生体系建立所需条件各异。本试验以红阳猕猴桃带芽茎段为外植体,通过调整不同植物生长调节剂浓度配比,直接诱导腋芽萌发,不定芽增殖与生根,建立了红阳猕猴桃带芽茎段的高效再生体系。

在猕猴桃组织培养中,一般常用猕猴桃叶片、叶柄、茎段、带芽茎段等作为外植体材料,研究表明,茎段、叶柄、叶片 3 种外植体愈伤组织芽再生率依次降低^[10-12]。与其它外植体材料相比,带芽茎段灭菌后可直接诱导腋芽萌发,得到无菌苗,较愈伤组织诱导不定芽节省时间。培养基中不同生长调节剂浓度配比对猕猴桃不定芽诱导、继代增殖、生根有很大影响。前人研究表明,6-BA 和 NAA 的组合可以诱导猕猴桃不定芽的萌发。本试验以 6-BA 和 NAA 组合作为诱导带芽茎段萌芽的培养基,获得了较高的萌芽率,最高达 88.37%,最适宜带芽茎段萌芽的组合是 $MS + 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} 6\text{-BA} + 0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{NAA}$,这与于红梅^[13]和隆前进^[14]用海沃德和红阳猕猴桃带芽茎段诱导再生芽的研究结果一致。在腋芽萌发过程中,带芽茎段出现较大程度的褐化。阳小成等^[15]提出在培养基中加入 0.01% 的抗氧化剂 PVP(聚乙烯吡咯烷酮)或 0.3% 的活性炭可以降低褐化率。在培养基中添加 GA_3 有利于组培苗伸长生长,可以壮苗。本试验在 6-BA 和 NAA 组合基础上添加 GA_3 ,其中 $MS + 2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} 6\text{-BA} + 0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{NAA} + 0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{GA}_3$ 培养基组合对不定芽增殖有良好促进作用,但继代培养后,不定芽相继出现玻璃化现象。而在 $MS + 1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ZT} + 0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{NAA}$ 培养基组合中,不定芽增殖效果好,继代后也能健康生长,说明 ZT 可有效促进不定芽的增殖,增殖效果比 6-BA 好。但 ZT 价格较 6-BA 贵,且在高压灭菌时容易被破坏。也有研究表明,可用 TDZ(苯基噻二唑基脲)替代 ZT 诱导不定芽^[16]。不定芽最佳生根培养基为 $1/2 \text{ MS} + 0.8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{IBA}$,诱导的根系分支多,组培苗长势健壮,炼苗后移栽成活率达到 90%

以上。

本试验通过带芽茎段直接诱导腋芽萌发,缩短了组织培养周期,建立了红阳猕猴桃带芽茎段高频再生体系,有利于日后猕猴桃生产上规模化快速繁育种苗。

参考文献:

- [1] 黄宏文,龚俊杰,王圣梅,等.猕猴桃属(*Actinidia*)植物的遗传多样性[J].生物多样性,2000,8(1):1-12.
- [2] Wang M, Li M, Meng A. Selection of a new red-fleshed kiwifruit cultivar 'Hong Yang' [J]. Acta Horticulturae (ISHS), 2003, 610: 115-17.
- [3] 王丽华,李明章,郑晓琴,等.红阳猕猴桃杂交后代果实性状的遗传[J].中国果树,2010(6):34-36.
- [4] 王丽华,郑晓琴,吴霞,等.红阳猕猴桃杂交后代部分果实性状的遗传倾向研究[J].中国南方果树,2011,40(4):82-83.
- [5] 梁一池,杨华.植物组织培养技术的研究进展[J].福建林学院学报,2002,22(1):93-96.
- [6] 刘小刚,焦晋,赵宇,等.野生软枣猕猴桃组织培养及褐变处理[J].中国农学通报,2013,29(19):113-119.
- [7] 刘永立,兰大伟,毕静华,等.葛枣猕猴桃组织培养中的器官形成与植株再生[J].果树学报,2005,22(3):220-223.
- [8] Bi J H, Liu Y L, Asghar S. In vitro organogenesis and plant regeneration from leaf explants of *Actinidia latifolia* [J]. Journal of Fruit Science, 2005, 22(4): 405-408.
- [9] 吕海燕,赵婷婷,钟彩虹,等.狗枣猕猴桃离体培养和快速繁殖研究[J].安徽农业科学,2017,45(17):116-118.
- [10] 尚霄丽,马春华,冯建灿,等.中华猕猴桃叶片再生体系的建立[J].江西农业学报,2010,22(4):50-52.
- [11] 周玲艳,秦华明,赖幸韵,等.猕猴桃实生苗组织培养的研究[J].北方园艺,2007(5):198-200.
- [12] 陈洪国,熊月明.不同外植体和生长调节剂对猕猴桃愈伤组织形成与再分化的影响[J].福建果树,2001(4):3-4.
- [13] 于红梅,赵密珍,钱亚明,等.海沃德猕猴桃带芽茎段的组织培养快繁技术[J].江苏农业科学,2014,42(11):78-79.
- [14] 隆前进,吴延军,谢鸣,等.红阳猕猴桃叶片和带芽茎段的组织培养快繁技术[J].浙江农业学报,2010,22(6):429-432.
- [15] 阳小成,王伯初,叶志义,等.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(自然科学版),2002,25(6):75-77.
- [16] 王顺才,马锋旺,徐凌飞.细胞分裂素和生长素对美味猕猴桃离体叶片再生的影响[J].园艺学进展(第六辑),2004:192-195.

Establishment of Regeneration System from Stem with Axillary Bud of Hongyang Kiwifruit

ZHANG Qian, LI Ming-zhang, WANG Li-hua, DU Kui, LIU Xin, FAN Gao-min

(Sichuan Provincial Academy of Natural Resource Sciences, Chengdu 610015, China)



不同激素浓度组合对甜叶菊幼叶诱导愈伤和芽分化的影响

苏彩霞,李惠芝,王玉泉,宝牡丹,赵文博

(兴安职业技术学院 农牧与生物工程系,内蒙古 乌兰浩特 137400)

摘要:为提高甜叶菊的组织培养效率,以甜叶菊幼叶为外植体,研究 75%消毒酒精和 0.1%氯化汞的不同消毒时间组合对外植体的消毒效果;以及不同激素浓度组合对外植体愈伤组织的诱导和芽分化的影响。结果表明:甜叶菊幼叶外植体材料的最佳灭菌条件为 75%消毒酒精 30 s,0.1%氯化汞 2 min;最佳诱导愈伤组织和分化芽培养基为 $MS+1.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ 6-BA}+0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ NAA}$,此时不定芽增长率为 85.7%,外植体适宜的生根培养基为 $1/2\text{ MS}+0.2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ IAA}$,生根率为 88.6%。

关键词:激素浓度组合;甜叶菊;诱导愈伤和分化芽

甜叶菊(*Stevia rebaudiana* Bertoni)又名甜菊,为菊科甜菊属多年生草本植物。甜菊糖是甜叶菊的主要化学成分之一,其甜度约为蔗糖的 300~400 倍,热量却仅为蔗糖的 1/300,是一种低热量、高甜度的天然甜味剂,享有“巴拉圭甜茶”之美名^[1-2]。由于此糖可预防肥胖症、高血压、小儿龋齿等疾病^[3],所以,近年来甜叶菊已被广泛地应用于医药与饮食业,深受人们青睐。甜叶菊在兴安盟地区栽培多年后,可知它的经济效益远远高于水稻、小麦、玉米等粮食作物,甜叶菊产业将是兴安盟的重要支柱性产业,但是甜叶菊外购苗的质量、价格等问题是影响它在兴安盟发展的瓶颈,而利用组培苗技术为农民提供大量甜叶菊苗,能够大大提高其产量和质量^[4-8],对兴安盟经济的发展有巨大的推动作用,据此,对本地区引进的甜叶菊栽培品种进行了组培快繁技术研究,以期得到甜

叶菊组培苗,旨在为本地区甜叶菊的组织培养育苗及规模化生产提供重要科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

采用兴安职业技术学院试验基地内种植的甜叶菊大田品种。

MS,蔗糖,琼脂,植物生长激素(6-BA、NAA、IAA)均由杭州木木生物科技有限公司提供。

1.2 方法

1.2.1 外植体消毒时间筛选 从生长健壮、无病虫害的甜叶菊植株上选取幼叶,首先在清水中漂洗 3~5 次,然后进行消毒处理,采用 3 个处理:① 75%酒精 10 s,0.1% HgCl_2 2 min;② 75%酒精 30 s,0.1% HgCl_2 2 min;③ 75%酒精 60 s,0.1% HgCl_2 4 min。消毒后的外植体最后在超净工作台内用无菌水冲洗 5~6 次备用。

1.2.2 诱导愈伤及芽分化 首先将消毒好的幼叶去掉叶尖和叶柄,其次将其余部分切成约 $0.5\text{ cm}\times 0.5\text{ cm}$ 的小块接种于诱导愈伤和分化芽培养基上,试验以 MS 为基础培养基,附加不同浓度 6-BA 和 NAA 激素组合,进行诱导愈伤和分

收稿日期:2018-01-20

基金项目:2015 年内蒙古兴安盟科技处重点资助项目。

第一作者简介:苏彩霞(1980-),女,硕士,副教授,从事园艺植物遗传育种与生物技术研究。E-mail: sucaixia2004@126.com。

Abstract: In order to establish the rapid breeding and efficient regeneration system of Hongyang Kiwifruit, the stem with axillary bud was used as explants to be cultured in the MS medium with different concentrations of hormones. The effects of different concentrations of hormones on axillary bud sprouting, multiplication and rooting were examined in this study. The results showed that the optimum medium for axillary bud sprouting was $MS+1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ 6-BA}+0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ NAA}$, the germination rate was 88.37%. The medium with $MS+1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ ZT}+0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ NAA}$ had best effect on adventitious bud multiplication. The rooting effect was best on the rooting medium with $1/2\text{ MS}+0.8\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ IBA}$, roots developed well and plants grew vigorous.

Keywords: Hongyang kiwifruit (*Actinidia chinensis*); tissue culture; stem with axillary bud