



李良良,李苇洁,吴迪,等.红阳猕猴桃快繁体系优化[J].黑龙江农业科学,2019(9):17-21.

红阳猕猴桃快繁体系优化

李良良,李苇洁,吴迪,韩振诚,王加国

(贵州省山地资源研究所,贵州 贵阳 550001)

摘要:为提高红阳猕猴桃组织培养效率,以红阳猕猴桃雌株幼嫩的不带芽枝条、带叶脉和不带叶脉叶片为外植体,通过不同激素(6-BA、NAA)不同浓度诱导外植体出不定芽、生根等处理,建立高效稳定的快速繁殖体系。结果表明:幼嫩的不带芽茎段和带叶脉的叶片极易形成愈伤组织和不定芽,经过筛选最适诱导不定芽的培养基分别为 $MS+3\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ 6-BA}+0.2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ NAA}$ 和 $MS+2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ 6-BA}+0.3\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ NAA}$,生长大量的愈伤组织之后萌发不定芽,出芽率均能达到 100%,成芽数/接种数分别达到 4.6 和 4.4。采用不带芽的幼嫩茎段为外植体时,减少了试验材料的浪费,两种培养基均能不断再生不定芽,省去了增殖培养基的筛选,节省了培育时间。 $1/2\text{ MS}+0.7\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ IBA}$ 诱导不定芽生根效果最佳,生根率达到 90%。

关键词:红阳猕猴桃;愈伤组织;不定芽;生根培养基

猕猴桃 (*Actinidia*) 属于猕猴桃科猕猴桃属植物,是 20 世纪野生果树人工驯化栽培成功的果树之一。因其风味独特,维生素 C 含量高,含有丰富的矿物质和多种人体必需的氨基酸等营养物质备受关注^[1-2]。红阳猕猴桃因果肉具有红色而广受猕猴桃育种者和消费者的青睐。贵州省六盘水市水城县 2000 年从四川苍溪引种红阳猕猴桃已经有 18 年种植历史。水城环境适宜于红阳猕

猴桃的生长,不仅成熟期比原产地提前 15 d 左右,果实品质也优于原产地,被指定为 2008 年北京奥运会指定果品、中国 2010 年上海世博会指定有机果品,基地于 2010 年被贵州省农委认证为无公害农产品生产基地,2014 年获国家地理标志农产品产地知识产权。

随着红阳猕猴桃栽培面积的不断扩大,良种壮苗的需求量也在不断增加。组织培养技术已经成为快速繁育猕猴桃的方法之一,不光是能快速繁育大量的优质苗,还有利于保存品种良好的性状^[3-7]。吴秀华等^[7]以海沃德猕猴桃的叶片为试验材料,通过不断的诱导筛选、生根等步骤,成功建立了离体快繁技术。隆前进等^[8]以红阳猕猴桃带芽茎段为外植体进行诱导试验,通过增殖不定芽和生根筛选最终建立了红阳猕猴桃的离体快繁体系。王珊等^[9]以红阳猕猴桃带芽茎段和再生苗

收稿日期:2019-03-28

基金项目:贵州省科技支撑计划(黔科合支撑[2017]2569);省市科技合作项目(52020-2016-S-KT-001);贵州科学院青年基金(黔科院 J 合字[2017]17 号);贵州省改革转制项目(黔科合 Z 字[2015]4001 号);贵州省科研机构创新能力建设项目(黔科合服企[2019]4004)。

第一作者简介:李良良(1989-),男,硕士,助理研究员,从事果树分子遗传育种研究。E-mail:lll0524@hotmail.com。

通讯作者:李苇洁(1977-),女,硕士,研究员,从事猕猴桃栽培与品种选育研究。E-mail:lwj024333@163.com。

Introduction Experiment of Konjac in Hulan District, Harbin City

WANG Yi-qi, ZHAO Jia-li, ZHONG Chong-jing, HUANG Dai

(College of Life Science and Technology, Harbin Normal University, Harbin 150025, China)

Abstract: Introduction is an important method to expand cultivation area of high quality germplasm resources. In order to explore the adaptability of konjac in Hulan district of Harbin City, field cultivation method was used to study the growth of konjac in Hulan district of Harbin City, and the content of konjac glucomannan was determined by 3,5-Dinitrosalicylic acid method. The results showed that the annual growth period of Konjac underground corms was about 168 days, and the highest coefficient of bulb expansion was 3.48. The content of konjac glucomannan was 56.45% in biennial and 64.35% in triennial, which indicated that konjac could be popularized and planted in Hulan district of Harbin City. The biennial konjac was suitable for breeding bulb.

Keywords: konjac; konjac glucomannan; introduction

的叶片为外植体,筛选得到不定芽的最适增殖培养基和诱导培养基。本试验以红阳猕猴桃为试验材料,优化离体培养成苗过程中 6-BA 和 NAA 激素比例以及筛选优质外植体,建立一个更加高效、稳定的快繁技术体系,为培育优质苗木奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

以水城县米箩镇贵州省猕猴桃产学研基地 5 年生红阳猕猴桃为试验材料,选取健壮的幼嫩带芽茎段、叶片(不含叶脉)、叶脉进行组织培养。

试验仪器有立式压力蒸汽灭菌锅、无菌操作台、电子天平、蒸馏水器、微量移液器。

1.2 方 法

1.2.1 消毒处理 试验于 2017 年 4 月进行。采带叶的一年生幼嫩枝条,用柔软的毛刷刷净表面的脏污,放入盆中,用细小的流水冲洗 5 h。在无菌超净工作台上,把叶面摘掉,分别进行消毒处理。用 75%酒精分别对不同外植体消毒,叶片消毒 30 s,不带芽茎段消毒 40 s,用无菌水冲洗 3 遍,在用 0.1%氯化汞进行消毒,叶片消毒 6 min,不带芽茎段消毒 8 min,处理后再用无菌水冲洗 5 遍。茎段剪成 1.5 cm 的茎段垂直插入培养基中。叶片剪成 1 cm×1 cm 的叶盘(不带叶脉叶片取叶身不含有叶脉部分,带叶脉叶片取含有中央脉叶片位置)接种在培养基中。

1.2.2 不定芽诱导培养基的筛选 将消毒灭菌过的外植体分别接种于不同激素浓度的培养基中,基本培养基为 MS 培养基,具体处理为 6-BA 分别为 1, 2, 3 mg·L⁻¹; NAA 分别为 0.1, 0.2, 0.3 mg·L⁻¹; 3 种外植体,共计 27 个处理,所有培养基含蔗糖为 30 g·L⁻¹,琼脂含量为 6 g·L⁻¹, pH 为 7.0。每个培养瓶接 1 个外植体,每处理 10 瓶,置于温度为 (25±1)℃,光照为 12 h·d⁻¹, 光强 100 μmol·m⁻²·s⁻¹ 的条件下培养,光照时间为每天 12 h。每天观察并记录愈伤和不定芽的生长情况,10 d 后统计愈伤形成率,30 d 统计出芽率,50 d 后统计成芽率。

1.2.3 生根培养基的筛选 以 1/2 MS 培养基为基本培养基,添加不同浓度的植物生长调节剂 IBA(0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8 mg·L⁻¹) 共 5 个处理,每个处理 10 瓶,每瓶接入一个长势基本一致的不定芽,每天观察并记录愈伤和不定芽的生长情况,10 d 后统计愈伤率,30 d 统计出芽率,50 d 后统计成芽率。

1.2.4 炼苗和移栽 移栽基质为珍珠岩:泥炭体积比 1:1,高温灭菌后,晾干使用,生根后的组培苗用高锰酸钾进行清洗,去除根部的培养基,种植于一次性的塑料杯中,上面再盖一个一次性塑料杯,逐步打开塑料杯,移栽温室,保持基质湿润,控制温度为 (27±2)℃,空气湿度为 80% 以上。观察记录炼苗及移栽成活情况。

1.2.5 数据分析 采用 Excel 2007 和 DPS 7.05 软件进行数据统计分析。

2 结果与分析

2.1 不同激素组合对不带芽茎段愈伤和诱导出芽率的影响

由表 1 可以看出,10 d 观察发现,6-BA 浓度为 1 mg·L⁻¹,随着 NAA 浓度的不断增加,出芽数在逐渐升高,不带芽茎段底部愈伤率并没有全部达到 100%,并且愈伤组织普遍黄绿色,质地较为紧密,出现的芽点较少,30 d 观察发现,仅有部分长出不定芽,长势较弱。6-BA 浓度为 2 mg·L⁻¹,10 d 观察发现,愈伤率达到 100%,颜色较为绿色,质地紧密,出现的芽点较多,30 d 观察发现,不定芽长势较为健壮。6-BA 浓度为 3 mg·L⁻¹,10 d 观察发现,不带芽茎段底部均能长出愈伤组织,颜色深绿。NAA 为 0.2 mg·L⁻¹,10 瓶处理均长出深绿色的愈伤组织,并且体积较大,芽点多且质地紧密。30 d 观察发现,不定芽密集生长,长势健壮,50 d 发现,部分不定芽能达到 2.5 cm,已经达到诱导生根的标准。不带芽茎段诱导的不定芽的最适培养基为 MS+3 mg·L⁻¹ 6-BA+0.2 mg·L⁻¹ NAA。

2.2 不同激素组合对叶片(不含叶脉)愈伤和诱导出芽率的影响

由表 2 可知,叶片(不含叶脉)的愈伤组织形成率很低,大部分在接种 10 d 后开始褐化,直接死亡,即使形成愈伤组织,成芽率同样很低。6-BA 浓度为 1 和 2 mg·L⁻¹ 时,10 d 观察发现,只有部分叶片在周边形成愈伤组织,颜色黄色,形成量很少,并没有发现芽点。30 d 观察发现,部分长出的不定芽,不健壮,生长缓慢,成芽数/接种数 ≤1。6-BA 浓度为 3 mg·L⁻¹,愈伤组织的形成率开始提高,但成芽数较少,长势较弱。由此可知,红阳猕猴桃叶片(不带叶脉)不适合作为外植体进行离体培养。

2.3 不同激素组合对叶脉愈伤和诱导出芽率的影响

由表 3 可以看出,形成愈伤组织的部位多集

中在外植体的边缘,尤其是叶脉处明显的膨大。10 d 观察发现,6-BA 浓度为 1 和 2 mg·L⁻¹时,随着 NAA 浓度的不断增加,出芽数在逐渐升高,叶脉愈伤率并没有全部达到 100%,并且愈伤组织普遍黄绿色,质地较为紧密,出现的芽点较多,30 d观察发现,NAA 浓度为 0.3 mg·L⁻¹,愈伤组织长出大量的不定芽,成密集生长,长势健壮,成芽数/接种数达到 4.4,50 d 后不定芽能达到

2.5~3.0 cm,可以用于生根诱导。6-BA 浓度为 3 mg·L⁻¹,10 d 观察发现,不带芽茎段底部均能长出愈伤组织,颜色深绿。NAA 为 0.2 mg·L⁻¹时,10 瓶处理均长出深绿色的愈伤组织,颜色较为深绿,芽点较少。30 d 观察发现,部分能长出不定芽,长势较为健壮,但成芽数并不是很高。叶脉诱导不定芽的最适培养基为 MS+2 mg·L⁻¹6-BA+0.3 mg·L⁻¹ NAA。

表 1 不同激素组合对不带芽茎段愈伤和不定芽形成的影响

Table 1 Effects of different hormone combinations on callus and adventitious bud formation in stems without buds							
激素 Hormone/(mg·L ⁻¹)		外植体个数/瓶 Number of explants/bottles	愈伤率 Callus rate/%	出芽数/瓶 Number of sprouts/bottles	出芽率 Germination rate/%	成芽数/个 Germination number	成芽数/接种数 Number of buds/inoculations
6-BA	NAA						
1	0.1	10	70	2	20	7	0.7
1	0.2	10	100	3	30	13	1.3
1	0.3	10	50	6	60	16	1.6
2	0.1	10	100	3	30	13	1.3
2	0.2	10	100	5	50	20	2.0
2	0.3	10	100	8	80	25	2.5
3	0.1	10	100	9	90	17	1.7
3	0.2	10	100	10	100	46	4.6
3	0.3	10	100	7	70	25	2.5

表 2 不同激素组合对叶片(不含叶脉)愈伤和不定芽形成的影响

Table 2 Effects of different hormone combinations on callus and adventitious bud formation in leaves (without veins)							
激素 Hormone/(mg·L ⁻¹)		外植体个数/瓶 Number of explants/bottles	愈伤率 Callus rate/%	出芽数/瓶 Number of sprouts/bottles	出芽率 Germination rate/%	成芽数/个 Germination number	成芽数/接种数 Number of buds/inoculations
6-BA	NAA						
1	0.1	10	0	0	0	0	0
1	0.2	10	20	1	10	0	0
1	0.3	10	10	0	0	0	0
2	0.1	10	20	2	20	4	0.4
2	0.2	10	40	3	30	9	0.9
2	0.3	10	50	5	50	10	1.0
3	0.1	10	40	4	40	7	0.7
3	0.2	10	60	8	80	16	1.6
3	0.3	10	30	6	60	11	1.1

表 3 不同激素组合对叶脉愈伤和不定芽形成的影响

Table 3 Effects of different hormone combinations on callus and adventitious bud formation in leaf vein

激素 Hormone/(mg·L ⁻¹)		外植体个数/瓶 Number of explants/bottles	愈伤率 Callus rate/%	出芽数/瓶 Number of sprouts/bottles	出芽率 Germination rate/%	成芽数/个 Germination number	成芽数/接种数 Number of buds/inoculations
6-BA	NAA						
1	0.1	10	60	4	40	9	0.9
1	0.2	10	80	5	50	14	1.4
1	0.3	10	100	7	70	17	1.7
2	0.1	10	90	5	50	9	0.9
2	0.2	10	100	6	60	16	1.6
2	0.3	10	100	10	100	44	4.4
3	0.1	10	100	7	70	17	1.7
3	0.2	10	100	7	70	19	1.9
3	0.3	10	100	9	90	26	2.6

2.4 不同激素处理对不定芽诱导生根的影响

将 2 cm 的健壮的不定芽接种到含有不同浓度 IBA 的培养基中,20 d 观察发现,大部分不定芽基部形成愈伤组织,接着开始生根。由表 4 可

以看出,随着 IBA 浓度的增加,生根数和生根率呈先高后低的趋势,最适合不定芽诱导生根的培养基为 1/2 MS+0.7 mg·L⁻¹ IBA。

表 4 不同激素处理对不定芽生根的影响

Table 4 Effects of different hormone treatments on rooting of adventitious buds

处理 Treatment	IBA/ (mg·L ⁻¹)	接种不定芽数/个 Number of adventitious buds inoculated	平均生根数/个 Average rooting number	生根率 Rooting rate/%
1	0.4	20	1.9±0.58	25
2	0.5	20	2.3±0.89	45
3	0.6	20	4.7±1.09	60
4	0.7	20	5.2±1.21	90
5	0.8	20	4.3±0.93	70

2.5 炼苗移栽

将生根培养基为 1/2 MS+0.7 mg·L⁻¹ IBA 的生根苗移栽到消毒后的基质中,成活率达到 65.8%。组培苗生长健壮,颜色鲜绿。

3 结论与讨论

本研究选用 3 种不同的外植体(不带芽茎段、叶脉、不含叶脉的叶片),最终得到两条快速得到组培苗的方法,分别为不带芽的茎段和叶脉作为外植体进行快繁,两种途径均能很好地扩繁出组培苗。隆前进等^[8]以红阳猕猴桃叶片和带芽茎段为外植体,成功培育出组培苗,本研究在此基础上进行改进,采用不带芽的茎段进行快繁,节省了材料。研究发现,MS+3 mg·L⁻¹ 6-BA+0.2 mg·L⁻¹ NAA 和 MS+2 mg·L⁻¹ 6-BA+0.3 mg·L⁻¹ NAA 两种培养基不需要对不定芽进行增殖培养,不定

芽生长到 2 cm 开始诱导生根,去除不定芽后的培养基可以继续按照上面的配方进行不定芽的诱导,节省了筛选增殖培养基的时间。

王珊等^[9]以红阳猕猴桃为外植体通过筛选不同培养基发现,采用 WPM 培养基能有效的减少褐化现象;阳小成等^[10]研究发现,中华猕猴桃在快繁过程中,褐化现象比较严重;刘延吉等^[11]以软枣猕猴桃为外植体进行快繁过程中也出现了严重的褐化现象。本试验在初步阶段采用 MS 培养基也出现了褐化现象,尤其是叶片褐化比较严重,通过减少酒精的灭菌时间发现,茎段褐化基本消失,与王珊等^[9]研究结论不同,可能原因是消毒时间不一致,也可能是外植体的幼嫩程度不同造成的,有待进一步的研究。高浓度的细胞分裂素会导致褐化现象的加重,像核桃^[12]、巨桉^[13]等,本研究并没有发现。高浓度的细胞分裂素是否会增

加红阳猕猴桃褐化现象,还需后续的试验验证。王珊等^[9]研究发现,红阳猕猴桃更适合在 WPM 培养基进行扩繁,认为 MS 高盐的培养基会对萌芽率有所降低,褐化率有所提高,与本研究不一致。王国琴^[14]研究发现,MS 培养基更利于红阳猕猴桃的快繁,与本研究结论一致。

现在大部分的研究多集中在带芽的幼嫩的茎段^[15-19],本研究采用不带芽幼嫩茎段,有效的节省了材料,采用 MS+3 mg·L⁻¹ 6-BA+0.2 mg·L⁻¹ NAA 培养基 10 d 就可以生长出大量的愈伤组织,30 d 就能生长出不定芽且长势健壮,60 d 左右就能得到 2 cm 左右的不定芽进行生根诱导,省去了不定芽增殖的步骤,节省了 time,剪去不定芽的愈伤组织可以更换培养基继续诱导不定芽。叶脉诱导采用 MS+2 mg·L⁻¹ 6-BA+0.3 mg·L⁻¹ 培养基,有效减少褐化现象,成芽率达到 4.4。采用 1/2 MS+IBA 0.7 mg·L⁻¹ 培养基对不定芽进行诱导,生根率达到 90%。本研究在前人研究的基础上成功优化了红阳猕猴桃植株再生体系,达到了快速育苗的目的,为下一步红阳猕猴桃细胞育种打下基础。

参考文献:

- [1] 徐小彪,张秋明.中国猕猴桃种质资源的研究与利用[J].植物学通报,2003(6):648-655.
- [2] 韩振诚,张辉,李苇洁,等.六个猕猴桃品种在六盘水市的品比试验[J].北方园艺,2017(12):15-20.
- [3] 严姜黎,张翼,邢梅,等.红肉猕猴桃离体快速繁殖技术研究[J].华中农业大学学报,2008,27(1):101-104.
- [4] 王明忠.红肉猕猴桃可持续育种的研究[J].资源开发与市

场,2003,19(5):309-310.

- [5] 汪克强,周建峰,王晓兵.红阳猕猴桃的栽培与管理[J].山西林业科技,2010(5):68-71.
- [6] 陈正华.木本植物组织培养[M].北京:高等教育出版社,1986.
- [7] 吴秀华,张艳玲,周月,等.‘海沃德’猕猴桃叶片高频直接再生体系的建立[J].植物生理学报,2013(8):759-763.
- [8] 隆前进,吴延军,谢鸣.‘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(4):429-432.
- [9] 王珊,黄雪云,陶玉,等.红阳猕猴桃的组织培养快繁技术[J].黑龙江农业科学,2018(3):72-76.
- [10] 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(6):75-77.
- [11] 刘延吉,任飞荣.软枣猕猴桃组织培养过程中外植体褐变的防止[J].北方园艺,2007(11):175-177.
- [12] 刘兰英.‘薄壳香’核桃组培中的褐化及防止措施研究[J].园艺学报,2002,29(2):171-172.
- [13] Bonga J M, Duran D J. Tissue culture in forestry Martinus[M]. Nijhoff: Dr. Junk Publisher,1982:228-235.
- [14] 王国琴.红阳猕猴桃快繁技术体系研究[D].成都:四川农业大学,2004:46-49.
- [15] 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.
- [16] 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.
- [17] 石玮,张玲,刘永胜.红阳猕猴桃叶片再生体系的建立[J].合肥工业大学学报(自然科学版),2015,38(4):1003-1005.
- [18] 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.
- [19] 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.

Optimization of the Rapid Propagation System of Hongyang Kiwifruit

LI Liang-liang, LI Wei-jie, WU Di, HAN Zhen-cheng, WANG Jia-guo

(Institute of Mountain Resources of Guizhou Province, Guiyang 550001, China)

Abstract: In order to improve the tissue culture efficiency of kiwifruit, the young non-budding branches, leaves with leaf veins and leaves without leaf veins of Hongyang kiwifruit were used as explants to establish an efficient and stable rapid propagation system by inducing adventitious buds and rooting of explants with different hormones (6-BA, NAA) at different concentrations. The results showed that young leaves without bud stems and leaves with veins were easy to form callus and adventitious buds. The optimal medium for inducing adventitious buds was MS+3 mg·L⁻¹ 6-BA+0.2 mg·L⁻¹ NAA and MS+2 mg·L⁻¹ 6-BA+0.3 mg·L⁻¹ NAA. The adventitious buds were germinated after growing a large amount of callus in the medium, and the germination rate reached 100%, and the number of germination/inoculation reached 4.6 and 4.4. In this study, young stems without buds were used as explants, which reduced the waste of test materials. Both media were able to continuously regenerate adventitious buds, eliminating the need for screening of value-added media and saving cultivation time. 1/2 MS+0.7 mg·L⁻¹ IBA induced the best rooting effect of adventitious buds, and the rooting rate reached 90%.

Keywords: Hongyang kiwifruit; callus; adventitious bud; rooting medium