

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.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2014.11.024

海沃德猕猴桃带芽茎段的组织培养快繁技术

于红梅,赵密珍,钱亚明,王 静,夏 谨,庞夫花

(江苏省农业科学院园艺研究所,江苏南京 210014)

摘要:以海沃德猕猴桃带芽茎段为外植体直接诱导再生芽,对继代增殖和生根等培养基进行筛选试验,建立海沃德猕猴桃组织培养快繁技术。结果表明:75%乙醇 30 s + 0.1% 氯化汞 8 min 为最佳消毒方法;诱导再生芽培养基为 MS + 1.0 mg/L 6-BA + 0.1 mg/L NAA;继代增殖培养基为 MS + 2.0 mg/L 6-BA + 0.1 mg/L NAA,其增殖系数为 3.60;生根培养基为 1/2MS + 0.7 mg/L IBA,生根率达 100%,平均生根数达 7.8 条。

关键词:猕猴桃;带芽茎段;组织培养;快繁技术

中图分类号:S663.404⁺.3 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2014)11-0078-02

猕猴桃(*Actinidia delikiosa*)是 20 世纪人工驯化栽培野生果树最有成就的四大果种之一^[1]。海沃德猕猴桃是新西兰选育的美味猕猴桃优良品种,其果肉细嫩、香气浓郁、口感香甜清爽、具有丰富的营养价值和良好的药用价值,被称为“果中之王”。因其具有味美、耐贮、货架期长、较好的丰产性等优点而深受果农和广大消费者喜爱,从而成为世界主栽品种。目前,猕猴桃的常规育苗方法主要为实生苗的嫁接法和成年株的扦插繁殖法。嫁接苗童期生长缓慢,育苗周期长达 2 年以上,而扦插苗成活率低^[2]。近年来,我国猕猴桃产业效益显著,栽培面积逐年扩大,传统育苗方法已不能满足规模化生产的需求,致使良种推广受到很大的限制。张海平等以其茎尖为外植体,经愈伤组织出芽建立快繁体系^[2]。吴秀华等以无菌苗的叶片为外植体,采用一步出芽法对不定芽进行诱导、增殖和生根,从而成功建立离体快繁体系^[3]。刘长春等以金富猕猴桃带芽茎段为外植体,诱导腋芽萌发芽,再通过增殖培养和生根建立了快繁体系^[4]。隆前进等以红阳带芽茎段为外植体进行出芽诱导,通过不定芽增殖和生根成功建立离体快繁体系^[5]。本试验在前人研究的基础上,以海沃德猕猴桃带芽茎段为外植体直接诱导再生芽,对继代增殖和生根等培养基等进行筛选试验,建立了海沃德猕猴桃组培快繁技术。

1 材料与方法

1.1 材料的选择

海沃德猕猴桃幼嫩新梢的带芽茎段采自江苏省农业科学院园艺研究所溧水基地,采集时间是 2012 年 4 月。

1.2 消毒方法

将材料经流水冲洗 1.5~2.0 h,在无菌操净工作台上,取 1.5 cm 带芽茎段先用 75% 医用乙醇消毒 30 s,接着无菌水冲洗 2 遍,然后按照以下处理要求分别进行消毒处理:A.0.1% 氯

化汞 6 min;B.0.1% 氯化汞 8 min;C.0.1% 氯化汞 10 min;D.10% 次氯酸钠 10 min;E.10% 次氯酸钠 12 min;F.10% 次氯酸钠 15 min;G.10% 双氧水 5 min;H.10% 双氧水 10 min;I.10% 双氧水 15 min,最后每个处理消毒后用无菌水冲洗 4~5 遍。

1.3 筛选诱导再生芽培养基

灭菌后切取 1.0 cm 带芽茎段,接入添加不同激素 6-BA (0.5、1.0、2.0 mg/L) 和 NAA 浓度 (0、0.1、0.2 mg/L) 组合的 MS 培养基,共 8 个处理。MS 培养基蔗糖含量为 30 g/L、琼脂含量为 6.5 g/L,pH 值为 5.8~6.0。每个处理接种带芽茎段 30 个,置于温度 (25±2)℃、光照强度约 2 400 lx 的条件下光照 14~16 h/d,15 d 后统计腋芽萌芽率。

1.4 筛选继代增殖培养基

以 MS 为基本培养基,添加不同激素 6-BA (0.5、1.0、2.0 mg/L) 和 NAA 浓度 (0、0.1、0.2 mg/L) 组合,共 9 个处理。选取上述腋芽萌发长势一致的健壮海沃德猕猴桃再生芽,接入以上 9 种 pH 值为 5.8~6.0 的继代增殖培养基中,光照条件同“1.3”,培养 20 d 后调查增殖效果及有效苗情况。

1.5 筛选生根培养基

选取长势一致的健壮海沃德猕猴桃组培苗,接入生根培养基中,共 11 个处理,不同激素 6-BA (0、0.5、0.7、1.0 mg/L) 和 NAA (0、0.1、0.3 mg/L) 浓度组合配比,其他条件同上。每个处理转接 30 管,每管 1 株,培养 12 d 后调查海沃德猕猴桃苗的生根率和平均生根数等。平均生根数 = 各处理所有根长大于 0.5 cm 根的总数/30。

1.6 炼苗移栽

打开生根试管苗保鲜膜,在室内放置 1~2 d,然后取出洗净培养基,移栽到配制好的基质里(进口泥炭:珍珠岩:蛭石的体积比为 6:3:1),保持湿度 90% 左右,适当遮阴,保持通风,增加光照,3 周后调查苗的成活率。

2 结果与分析

2.1 不同消毒剂的消毒效果

选用氯化汞、次氯酸钠、双氧水 3 种表面消毒剂分别对海沃德猕猴桃带芽茎段消毒处理不同时间,10 d 后调查消毒效果。结果表明:氯化汞消毒效果明显比次氯酸钠、双氧水好;次

收稿日期:2014-07-22

基金项目:江苏省农业科技自主创新资金[编号:CX(13)2013];江苏省科技支撑计划(编号:BE2012324)。

作者简介:于红梅(1976—),女,江苏兴化人,助理研究员,主要从事抗病育种工作。Tel:(025)84390219;E-mail:yhmjxsh@163.com。

氯酸钠对外植体切口的损害较重,褐化多,双氧水对外植体消毒不彻底,污染、褐化较严重。处理 B 消毒效果最佳(表 1)。

表 1 不同消毒剂对猕猴桃带芽茎段的消毒效果

| 处理 | 接种数 (个) | 污染数 (个) | 死亡数 (个) | 褐化数 (个) | 切口损伤程度 |
|----|------------|------------|------------|------------|--------|
| A | 30 | 1 | 0 | 0 | 轻 |
| B | 30 | 0 | 0 | 0 | 轻 |
| C | 30 | 0 | 0 | 4 | 中 |
| D | 30 | 1 | 0 | 6 | 轻 |
| E | 30 | 0 | 5 | 7 | 重 |
| F | 30 | 0 | 7 | 13 | 重 |
| G | 30 | 30 | 6 | 6 | 轻 |
| H | 30 | 28 | 9 | 11 | 轻 |
| I | 30 | 22 | 14 | 16 | 轻 |

2.2 6-BA 和 NAA 浓度对比对再生芽诱导的影响

由表 2 可知,添加 NAA 的基本培养基都可以萌芽,在 0~2.0 mg/L 6-BA 处理下,以 1.0 mg/L 6-BA 萌芽率最高,随 6-BA 浓度的增大,萌芽率略降低。NAA(0.1~0.2 mg/L)处理的萌芽情况取决于 6-BA 浓度的配比,添加激素的最佳配比为 1.0 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA,萌芽率达 93.33%,其次为 2.0 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA,萌芽率达 86.67%。

表 2 不同激素 6-BA 和 NAA 浓度对比对诱导再生芽的影响

| 激素配比(mg/L) | | 外植体数 (个) | 萌芽率 (%) |
|------------|-----|-------------|------------|
| 6-BA | NAA | | |
| 0 | 0.1 | 30 | 43.33 |
| 0.5 | 0.1 | 30 | 56.67 |
| 1.0 | 0.1 | 30 | 93.33 |
| 2.0 | 0.1 | 30 | 86.67 |
| 0.0 | 0.2 | 30 | 46.67 |
| 0.5 | 0.2 | 30 | 50.00 |
| 1.0 | 0.2 | 30 | 83.33 |
| 2.0 | 0.2 | 30 | 66.67 |

2.3 6-BA 和 NAA 浓度对比对继代增殖的影响

由表 3 可见,MS 培养基中 6-BA 浓度为 2 mg/L 的增殖系数为 2.97~3.60,1.0 mg/L 的增殖系数为 2.73~3.03,0.5 mg/L 的增殖系数为 2.03~2.67,表明一定浓度范围内,6-BA 浓度增加有利于芽的增殖,培养基中含 NAA 多少与芽增殖无线性关系,但 NAA 可促进生长。0.1 mg/L NAA+2.0 mg/L 6-BA 为海沃德猕猴桃最适的继代增殖配比浓度。

表 3 不同激素浓度对比对继代增殖的影响

| 激素配比 (mg/L) | | 增殖系数 | 有效苗率 (%) | 生长状况 |
|----------------|-----|------|-------------|---------------|
| 6-BA | NAA | | | |
| 0.5 | 0 | 2.03 | 77.22 | 增殖低,生长慢 |
| 0.5 | 0.1 | 2.67 | 83.33 | 增殖一般,生长慢 |
| 0.5 | 0.2 | 2.27 | 73.12 | 增殖低,生长一般,根少许 |
| 1.0 | 0 | 2.73 | 87.23 | 增殖良好,生长一般 |
| 1.0 | 0.1 | 3.03 | 88.35 | 增殖良好,生长较快 |
| 1.0 | 0.2 | 2.87 | 79.63 | 增殖低,生长较快,根少许 |
| 2.0 | 0 | 2.97 | 81.65 | 增殖、生长一般 |
| 2.0 | 0.1 | 3.60 | 89.26 | 增殖良好,生长较快 |
| 2.0 | 0.2 | 3.10 | 83.78 | 增殖一般,生长较快,根少许 |

2.4 不同激素对海沃德猕猴桃生根的影响

选取长势一致的健壮猕猴桃组培苗,接到不同激素浓度配比 1/2MS 培养基中进行生根对比,12 d 后调查生根情况,结果见表 4。激素浓度对比对再生芽生根率的影响较明显,

IBA 浓度相同时,NAA 浓度增加对根的生长有抑制作用,纤细且短。IBA 浓度为 0.7 mg/L 时,不添加 NAA,生根率达 100%,且根粗壮、发达,平均生根数多达 7.80 条。

表 4 不同培养基对海沃德猕猴桃生根的培养

| 激素配比(mg/L) | | 接种数 (个) | 生根率 (%) | 平均生根数 (条) |
|------------|-----|------------|------------|--------------|
| IBA | NAA | | | |
| 0 | 0 | 30 | 80.0 | 3.60 |
| 0.5 | 0 | 30 | 83.3 | 3.40 |
| 0.5 | 0.1 | 30 | 100.0 | 2.17 |
| 0.5 | 0.3 | 30 | 86.7 | 1.13 |
| 0.7 | 0 | 30 | 100.0 | 7.80 |
| 0.7 | 0.1 | 30 | 100.0 | 4.00 |
| 0.7 | 0.3 | 30 | 56.7 | 0.63 |
| 1.0 | 0 | 30 | 100.0 | 4.30 |
| 1.0 | 0.1 | 30 | 93.3 | 1.77 |
| 1.0 | 0.3 | 30 | 90.0 | 0.80 |

3 小结

目前,利用现代生物技术进行组织离体再生培养已在植物的无性繁殖中广泛应用。培养基中的不同激素浓度对比对猕猴桃诱导愈伤组织、继代增殖、生根均有很大的影响^[6-7]。本试验在前人研究的基础上缩小 6-BA、NAA 和 IBA 激素的浓度配比梯度,建立海沃德猕猴桃带芽茎段的组织培养快繁技术。尝试应用海沃德猕猴桃带芽茎段跳过愈伤组织诱导不定芽,直接诱导腋芽萌发再生芽,植株整齐生长快,其再生芽萌发率达到 100%。在继代增殖过程中,合理使用 6-BA、NAA 配比浓度,增殖系数达到 3.60,低于吴秀华等的“海沃德平均繁殖系数为 6.38”的结果^[3],但本试验有效苗率达 89.26%,提高了再生芽品质。在生根过程中,不定根的生根率达 100%,明显高于张海平等的“海沃德猕猴桃中获得的生根率为 90.0%”的结果^[2],与吴秀华等的海沃德猕猴桃生根率试验结果^[3]相同。在海沃德猕猴桃移栽时,平均生根数直接影响组培苗的移栽存活率,张海平等指出选用进口泥炭的成活率达 95%,吴秀华等证明普通基质移栽成活率 92.38%^[3],而本试验在通气性较好的进口泥炭、珍珠岩、蛭石混合基质中,根系能够得到良好发育,移栽成活率达到 96.7%,本试验生根时间缩短至 12 d,同时跳过愈伤组织诱导不定芽,快繁周期大为缩短,利于生产上规模化快速繁育种苗。

参考文献:

[1] Warring, ton I J, Weston G C. Kiwifruits: science and management [M]. Auckland: Ray Richards Publisher, 1990.

[2] 张海平, 周建峰, 任目瑾. 海沃德猕猴桃组织培养快速繁育技术研究[J]. 陕西林业科技, 2011(2): 8-11.

[3] 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, 49(8): 759-763

[4] 刘长春, 陈泽雄, 龚雪芹, 等. 金富猕猴桃离体培养与植株再生的优化研究[J]. 西南师范大学学报: 自然科学版, 2007, 32(5): 124-128.

[5] 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(4): 429-432

[6] 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, 200329(3): 295-299.

[7] 刘长江, 刘国成, 赵德英, 等. 野生软枣猕猴桃茎尖培养研究[J]. 中国果树, 2009(2): 32-34.