

吴燕燕,章辰飞,吴志勇,等.金艳猕猴桃组织培养适宜条件筛选[J].江苏农业科学,2019,47(21):111-114.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.21.025

# 金艳猕猴桃组织培养适宜条件筛选

吴燕燕,章辰飞,吴志勇,吴月燕

(浙江万里学院,浙江宁波 315100)

**摘要:**以金艳猕猴桃嫩叶、茎段作为外植体材料,研究不同消毒体系灭菌效果及不同激素组合对愈伤组织、不定芽、生根等诱导的影响。结果表明,叶片消毒相对最优方法为70%乙醇30 s+0.1% HgCl<sub>2</sub> 3 min,茎段消毒相对最优方法为70%乙醇30 s+0.1% HgCl<sub>2</sub> 4 min;茎段比叶片更容易染菌,而叶片比茎段更容易褐化;愈伤组织诱导时,叶片最优激素组合为6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.1 mg/L,茎段为6-BA 0.1 mg/L+NAA 0.1 mg/L;不定芽诱导最优激素组合为6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L,在此条件下不定芽长势较快,含单芽或多芽,有少量愈伤组织;最适生根培养基为1/2MS+IBA 0.8 mg/L,生根率达到87.78%,植株生长健壮,根密、多。

**关键词:**金艳;猕猴桃;组织培养;激素;愈伤组织;嫩叶;茎段

**中图分类号:** S663.404<sup>+</sup>.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2019)21-0111-04

在猕猴桃快繁技术体系建立中,通常是以叶片、叶柄、茎尖、茎段、种子等作为外植体进行研究的<sup>[1-6]</sup>,而不同外植体材料对愈伤组织、不定芽的诱导能力有很大差别,如甘丽萍等研究指出,嫩茎是诱导愈伤组织最好的外植体<sup>[7]</sup>。对同一种外植体而言,不同放置方式也会影响快繁效果,有研究表明,叶片上表面朝下的愈伤组织诱导率较高,茎段横放比竖放诱导效果好<sup>[8]</sup>。同时,在组织培养过程中,不同生长调节剂(激素)会发挥不同的作用,生长素、细胞分裂素在组织培养中对组织生长起着非常关键的作用。另外,碳源种类、浓度等也会影响组织培养快繁效果,有研究表明,低浓度碳源不能很好诱导芽的分化形成,而过高浓度碳源虽可促进芽分化,但抑制苗的生长<sup>[9]</sup>。

金艳是中国科学院武汉植物园以“毛花”猕猴桃为母本,“中华”猕猴桃为父本杂交培育出的猕猴桃新品种<sup>[10]</sup>,具有丰产、稳产、可溶性固形物含量高、果实极耐贮藏、糖酸比高等优良特性<sup>[10-11]</sup>,目前鲜见对金艳猕猴桃组织培养快繁的研究报道。本试验以金艳猕猴桃茎段、叶片为外植体,设计不同激素浓度及配比,以筛选出适宜金艳猕猴桃组织培养快繁的条件,为金艳猕猴桃的快速推广应用奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料选择

2017年4—5月,于浙江省宁波市北仑区北仑芳野瓜果有限公司猕猴桃基地采取金艳猕猴桃带有嫩叶的新梢茎段,冰箱中4℃冷藏。

### 1.2 不同消毒剂及消毒时间对金艳猕猴桃外植体的灭菌效果

收稿日期:2018-08-22

基金项目:浙江省一流学科(A)生物工程创新(编号:CX2017013)。

作者简介:吴燕燕(1993—),女,浙江杭州人,硕士,从事植物生理生化研究。E-mail:935986197@qq.com。

通信作者:吴月燕,硕士,从事遗传育种研究。E-mail:wyyhb2009@163.com。

将采集的金艳猕猴桃带叶茎段,去烂叶烂头,用洗洁精清洗1次,再用流水冲洗30 min;分别取3~6 cm的茎段、5~30 cm<sup>2</sup>的嫩叶,分别以70%乙醇、0.1%氯化汞(HgCl<sub>2</sub>)处理不同时间进行灭菌消毒;无菌水清洗4~5次,滤干,用无菌纸吸干茎段或嫩叶表面水分;切取茎段长约1 cm、叶片约0.5 cm<sup>2</sup>,并接种到培养基上,定期观察外植体污染、褐化数量及生长情况,统计污染率、褐化率,计算消毒效果<sup>[7]</sup>。

### 1.3 不同激素组合对愈伤组织、不定芽、生根的诱导情况

**1.3.1 愈伤组织诱导** 无菌环境条件下,将经预处理的叶片及茎段分别接种到以MS为基础培养基,分别添加有6-苄氨基嘌呤(6-BA)0.1、0.5、1.0、1.5、2.0 mg/L和萘乙酸(NAA)0.1、0.5 mg/L为组合激素的培养基上,共设置10个处理;接种后20 d调查各处理愈伤组织诱导情况,统计诱导率。

**1.3.2 不定芽诱导** 无菌环境条件下,将愈伤组织转接到以MS为基础培养基,分别添加有6-BA 0.5、1.0、1.5 mg/L和NAA 0.1、0.3、0.5 mg/L为组合激素的培养基上,共设置9个处理;接种后20 d调查各处理愈伤组织不定芽诱导情况。

**1.3.3 生根诱导** 无菌环境条件下,将诱导形成带有4~5张叶片的不定芽转接到以1/2MS培养基为基础培养基,分别添加吲哚丁酸(IBA)0.5、0.6、0.7、0.8、0.9 mg/L的生根培养基上进行生根培养,接种后30 d调查统计生根情况。

### 1.4 培养条件

诱导培养基中须同时添加蔗糖30 g/L、琼脂7 g/L,pH值调控到在5.7~5.8之间。培养室内培养温度为23~26℃,光照度为1 000~1 500 lx,光照时间为16 h/d。

### 1.5 统计分析

采用Excel 2010软件对试验数据进行统计分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同消毒剂及消毒时间对金艳猕猴桃外植体的灭菌效果

消毒不仅是将外植体表面的微生物去除,同时也是对外植体自生菌的消减,会对外植体本身造成一定影响,而消毒剂

种类和消毒时间的不同会影响其对外植体的消毒效果。由表 1 可知,叶片消毒效果相对最好的方法为 70% 乙醇 30 s + 0.1% HgCl<sub>2</sub> 3 min, 此时污染率为 12.50%, 褐化率为 12.50%, 消毒效果达到 87.50%, 茎段消毒效果相对最好的方法为 70% 乙醇 30 s + 0.1% HgCl<sub>2</sub> 4 min, 此时污染率为 7.50%, 褐化率为 10.00%, 消毒效果达到 91.25%; 同种消毒剂消毒不同时间, 对金艳猕猴桃外植体的效果差异较大, 消毒剂为 70% 乙醇时, 不同消毒时间叶片污染率高低为 10 s > 20 s > 30 s, 茎段为 10 s > 20 s = 30 s, 消毒剂为 0.1% HgCl<sub>2</sub> 时, 不同消毒时间叶片污染率高低依次为 3 min > 4 min > 5 min, 茎段为 3 min > 4 min = 5 min, 说明消毒时间越长, 外植

体灭菌效果相对越好; 同一消毒剂消毒相同时间, 茎段污染率多高于叶片, 说明茎段比叶片更容易染菌, 这可能是由于茎段采集时会产生伤口, 进而导致茎段更易遭受外生菌和内生菌侵染; 消毒剂为 70% 乙醇时, 不同消毒时间叶片褐化率高低依次为 20 s = 30 s > 10 s, 茎段为 30 s > 20 s > 10 s, 消毒剂为 0.1% HgCl<sub>2</sub> 时, 不同消毒时间叶片、茎段褐化率高低均依次为 5 min > 4 min > 3 min, 说明消毒时间越长, 消毒剂对叶片、茎段伤害越大, 并主要表现在外植体的切面上; 同一消毒剂消毒相同时间, 叶片的褐化率多高于茎段, 其褐化程度相对更为严重, 这一方面可能是由于切取叶片时受到的机械伤害大于茎段, 另一方面可能是消毒剂对叶片的毒害作用高于茎段。

表 1 不同消毒剂及消毒时间对灭菌效果的影响

消毒剂消毒时间		接种数 (个)	污染率(%)		褐化率(%)		消毒效果(%)	
乙醇(s)	HgCl <sub>2</sub> (min)		叶片	茎段	叶片	茎段	叶片	茎段
10	0	40	95.00	97.50	0.00	0.00	52.50	51.25
20	0	40	90.00	95.00	5.00	2.50	52.50	51.25
30	0	40	82.50	95.00	5.00	5.00	56.25	50.00
0	3	40	65.00	70.00	12.50	10.00	61.25	60.00
0	4	40	45.00	55.00	20.00	10.00	67.50	67.50
0	5	40	32.50	55.00	50.00	17.50	58.75	63.75
10	3	40	27.50	45.00	15.00	15.00	78.75	70.00
10	4	40	25.00	42.50	15.00	17.50	80.00	70.00
10	5	40	20.00	22.50	25.00	10.00	77.50	83.75
20	3	40	15.00	27.50	12.50	12.50	86.25	80.00
20	4	40	17.50	22.50	32.50	10.00	75.00	83.75
20	5	40	12.50	7.50	25.00	12.50	81.25	90.00
30	3	40	12.50	15.00	12.50	10.00	87.50	87.50
30	4	40	10.00	7.50	35.00	10.00	77.50	91.25
30	5	40	10.00	10.00	42.50	25.00	73.75	82.50

2.2 不同激素组合对愈伤组织、不定芽、生根诱导的影响

2.2.1 对愈伤组织诱导的影响 叶片、茎段诱导形成的愈伤组织分别见图 1、图 2, 影响结果见表 2。由表 2 可知, 诱导产生叶片愈伤组织的相对最适激素组合为 6-BA 0.5 mg/L + NAA 0.1 mg/L, 其诱导率为 90.0%, 而激素组合 6-BA 1.5 mg/L + NAA 0.5 mg/L 的诱导率相对最低, 仅为 48.5%; 诱导产生茎段愈伤组织的相对最适激素组合为 6-BA 0.1 mg/L + NAA 0.1 mg/L, 其诱导率为 97.5%, 而激素组合 6-BA 1.0 mg/L + NAA 0.5 mg/L 的诱导率相对最低, 仅为 43.0%; NAA 质量浓度一定时, 随 6-BA 质量浓度的增加, 叶

片愈伤组织诱导率总体呈先增后降趋势, 说明适度低质量浓度 6-BA 有利于叶片愈伤组织的产生, 而高质量浓度 6-BA 不利于叶片愈伤组织的产生; 对茎段而言, NAA 质量浓度为 0.1 mg/L 时, 随 6-BA 质量浓度的增加, 茎段愈伤组织诱导率呈逐渐下降趋势, 而在 NAA 质量浓度为 0.5 mg/L 时, 茎段愈伤组织诱导率呈先下降后上升趋势, NAA 0.5 mg/L + 6-BA 1.0 mg/L 更不利于茎段诱导产生愈伤组织。

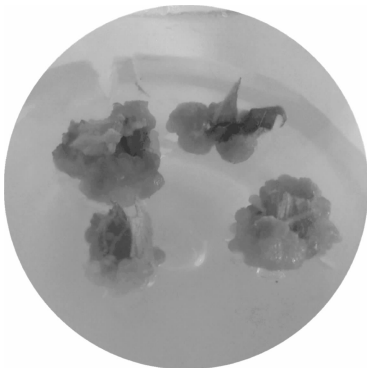


图1 叶片诱导愈伤组织



图2 茎段诱导愈伤组织

2.2.2 对不定芽诱导的影响 由表 3 可知, 激素组合 6-BA 1.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L 时, 不定芽分化率相对最高, 达到 65.00%, 不定芽长势较快, 含有单芽或多芽, 有少量愈伤组织

产生;当 NAA 质量浓度为 0.1 mg/L 时,随 6-BA 质量浓度的增加,愈伤组织不定芽分化率呈先增后降趋势,当 NAA 质量浓度分别为 0.3、0.5 mg/L 时,随 6-BA 质量浓度的增加,愈伤组织不定芽分化率呈增加趋势,说明高质量浓度 6-BA 有利于不定芽的分化,而 NAA 为 0.1 mg/L 时出现的下降可

能是由于 6-BA 与 NAA 用量比值过高,抑制了不定芽的产生;6-BA 质量浓度一定时,随 NAA 质量浓度的增加,不定芽分化率呈逐渐下降趋势,高质量浓度 NAA 抑制愈伤组织分化成不定芽,还对不定芽的生长产生抑制作用。

表 2 不同激素组合对愈伤组织诱导的影响

激素质量浓度 (mg/L)		接种数 (个)	愈伤组织数 (个)		诱导率 (%)	
6-BA	NAA		叶片	茎段	叶片	茎段
0.1	0.1	200	135	196	67.5	97.5
0.5	0.1	200	180	173	90.0	86.5
1.0	0.1	200	172	154	87.5	77.0
1.5	0.1	200	161	149	80.5	74.5
2.0	0.1	200	145	136	72.5	68.0
0.1	0.5	200	111	157	55.5	78.5
0.5	0.5	200	151	94	75.5	47.0
1.0	0.5	200	160	86	80.0	43.0
1.5	0.5	200	97	104	48.5	52.0
2.0	0.5	200	139	128	69.5	64.0

表 3 不同激素组合对不定芽诱导的影响

激素质量浓度 (mg/L)		愈伤组织数 (个)	不定芽数 (个)	分化率 (%)	不定芽长势情况
6-BA	NAA				
0.5	0.1	240	78	32.50	单芽,生长一般
1.0	0.1	240	156	65.00	单或多芽,生长较快,有少量愈伤
1.5	0.1	240	109	45.40	单或多芽,长势一般,有愈伤
0.5	0.3	240	48	20.00	单芽,长势一般,有愈伤
1.0	0.3	240	72	30.00	单芽,长势一般,有愈伤
1.5	0.3	240	90	37.50	单芽,长势一般
0.5	0.5	240	12	5.00	有愈伤
1.0	0.5	240	30	12.50	单芽,长势较差,有大量愈伤
1.5	0.5	240	42	17.50	单芽,长势一般,有愈伤

2.2.3 对生根培养的影响 图 3 为不定芽诱导形成的苗,图 4 为生根的无菌苗,对生根培养的影响结果见表 4,由表 4 可知,随 IBA 浓度的增加,不定芽生根率呈先升后降趋势,IBA 质量浓度为 0.8 mg/L 时生根率相对最高,达到 87.78%,此时植株生长健壮,根密、多;IBA 质量浓度分别为 0.5、0.9 mg/L 时,不定芽生根率都低于 25.0%,说明 IBA 质量浓度过低或过高都不利于根的生长。

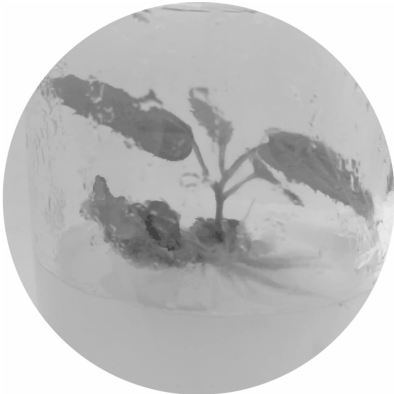


图3 不定芽诱导成苗

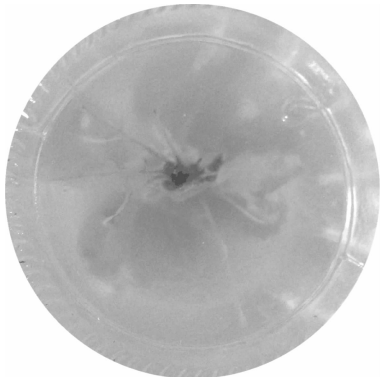


图4 无菌苗的根

3 结论与讨论

外植体灭菌是植物组织培养中至关重要且必不可少的环节,而消毒剂的选择与使用十分关键。消毒剂种类很多,找到适宜的消毒剂和消毒时间对组织培养可起到事半功倍的作用。于红梅等研究认为,0.1% HgCl<sub>2</sub> 作为消毒剂,其消毒效果明显好于NaClO、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>[7]</sup>。本试验结果表明,叶片最适消

表 4 不同 IBA 质量浓度对不定芽生根的影响

IBA 质量浓度 (mg/L)	接种数 (个)	生根数 (个)	生根率 (%)	生根状况
0.5	90	17	18.89	根稀疏、极少
0.6	90	56	62.22	植株生长较健壮、根稀疏、较少
0.7	90	76	84.44	植株生长健壮、根密、较多
0.8	90	79	87.78	植株生长健壮、根密、多
0.9	90	22	24.44	根稀疏、少

毒组合为 70% 乙醇 30 s + 0.1% HgCl<sub>2</sub> 3 min, 消毒效果达到 87.50%; 茎段消毒最适组合为 70% 乙醇 30 s + 0.1% HgCl<sub>2</sub> 4 min, 消毒效果达到 91.25%; 茎段比叶片更容易染菌, 这可能是由于茎段采集时会产生伤口, 进而导致茎段更易遭受外生菌和内生菌侵染; 叶片比茎段更容易褐化, 这可能是由于切取叶片时受到的机械伤害大于茎段, 或是消毒剂对叶片的毒害作用高于茎段。

生长素是植物愈伤组织诱导中必须使用的物质<sup>[12-13]</sup>。杜希华等研究指出, 培养基中只添加 6-BA 是无法诱导出愈伤组织的, 生长素和细胞分裂素的配合使用有利于愈伤组织的诱导<sup>[14]</sup>。本试验结果表明, 在一定质量浓度范围内, 低质量浓度 6-BA 有利于叶片愈伤组织的产生, 而高质量浓度 6-BA 不利于叶片愈伤组织的产生; NAA 质量浓度为 0.1 mg/L 时, 随 6-BA 质量浓度的增加, 茎段愈伤组织诱导率呈逐渐下降趋势, 而在 NAA 质量浓度为 0.5 mg/L 时, 茎段愈伤组织诱导率呈先下降后上升趋势, NAA 0.5 mg/L + 6-BA 1.0 mg/L 更不利于茎段诱导产生愈伤组织, 这与吴兴海的研究结果<sup>[15]</sup>较为吻合。

细胞分裂素对猕猴桃愈伤组织分化和芽分化诱导起关键作用<sup>[16]</sup>。朱宝成等认为, NAA 除能诱导愈伤组织分化外, 还能跟 6-BA 配合使愈伤组织分化出芽和根<sup>[17]</sup>。杨成行等研究表明, 金线莲再生培养体系中, 细胞分裂素和生长素配合使用能促进丛生芽的诱导<sup>[18]</sup>。本试验结果表明, 6-BA 质量浓度一定时, 随 NAA 质量浓度的增加, 不定芽分化率呈逐渐下降趋势, 高质量浓度 NAA 抑制愈伤组织分化成不定芽, 还对不定芽的生长产生抑制作用, 这可能是由于 NAA 作为生长素诱导形成愈伤组织的效果要明显优于不定芽, 同时也符合生长素与细胞分裂素比值越小则越有利于芽分化, 而比值越大则有利于根分化的试验规律; NAA 质量浓度为 0.1 mg/L 时, 随 6-BA 质量浓度的增加, 愈伤组织不定芽分化率呈先增后降趋势, 这种下降的出现可能与 6-BA、NAA 比值过高而存在毒副作用, 从而抑制不定芽的产生<sup>[15]</sup>有关。

吴兴海研究指出, 使用 IBA 0.6 mg/L 诱导猕猴桃生根时会产生少量愈伤组织, 生根率低, 且芽的生长受到抑制<sup>[15]</sup>。隆前进认为, 高质量浓度 IBA 处理猕猴桃扦插苗可能会有毒害作用而降低其生根率<sup>[19]</sup>。本试验结果表明, 金艳猕猴桃最适生根的 IBA 质量浓度为 0.8 mg/L, 其生根诱导率相对最高, 达 87.78%, 而不论是低质量浓度 IBA 还是更高质量浓度 IBA 都不利于根的生长; IBA 质量浓度为 0.9 mg/L 时猕猴桃生根率出现骤降, 可能与高质量浓度 IBA 对不定芽产生毒害

作用有关。

参考文献:

[1] 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.

[2] 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.

[3] 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.

[4] 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.

[5] 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.

[6] 朱道圩, 王静毅, 吕宗强. 猕猴桃实生苗组织培养体系建立的研究[J]. 落叶果树, 2005(2): 5-7.

[7] 甘丽萍, 阮神清, 曾晓琳. “三峡虹”红阳猕猴桃组织培养体系的筛选[J]. 北方园艺, 2016, 9: 114-117.

[8] 陈明霞. 怀山药叶片和茎段的离体培养及形态发生中组织细胞学和生理学的研究[D]. 新乡: 河南师范大学, 2001: 2-15.

[9] 谢志兵. 水解酪蛋白和不同碳源在猕猴桃组织培养的作用[J]. 农业与技术, 2003(4): 56-59.

[10] 钟彩虹, 张鹏, 韩飞, 等. 猕猴桃种间杂交新品种‘金艳’的果实发育特征[J]. 果树学报, 2015, 32(6): 1152-1160.

[11] 李纪华, 杨纪红, 李光华, 等. 金艳猕猴桃在河南西峡引种表现与栽培技术要点[J]. 果树实用技术与信息, 2017(9): 10-12.

[12] 谭彬, 郭水欢, 韩亚萍, 等. 毛桃叶片愈伤组织诱导[J]. 江苏农业科学, 2017, 45(5): 37-40.

[13] 刘义存, 黄天启, 林顺权. 枇杷属若干野生种叶片愈伤组织诱导和再分化[J]. 江苏农业科学, 2018, 46(5): 32-35.

[14] 杜希华, 孙秀玲, 郝岗平, 等. 不同外植体和激素对银杏愈伤组织诱导和生长的影响[J]. 山东师范大学学报(自然科学版), 2008, 23(1): 129-133.

[15] 吴兴海. 虎掌和猕猴桃组织培养的研究[D]. 西安: 陕西师范大学, 2003: 28-31.

[16] 牛晓林. 长白山软枣猕猴桃组织培养和快繁技术研究[D]. 南京: 南京林业大学, 2012: 9-12.

[17] 朱宝成, 吴爱民, 成亚利, 等. 药用作物掌叶半夏组织培养及药物成分分析[J]. 作物学报, 1995(4): 475-478.

[18] 杨成行, 李晓婷, 袁建振, 等. 金线莲组织培养技术研究进展[J]. 草业科学, 2018, 35(5): 1047-1056.

[19] 隆前进. 猕猴桃组织培养和快繁技术研究[D]. 金华: 浙江师范大学, 2010: 22-27.