

# 野生软枣猕猴桃离体培养体系的建立及优化

朴一龙, 朴日子

(延边大学 农学院, 吉林 延吉 133000)

**摘 要:**以长白山野生软枣猕猴桃茎段作为外植体,采用 6-BA 配合 NAA 以及 ZT 配合 NAA 2 种组合研究了适于野生软枣猕猴桃离体再生的类型和植物生长调节剂组合,筛选各培养阶段高频、稳定的适宜培养基,建立了野生软枣猕猴桃离体培养快繁体系。结果表明:外植体以侧芽为佳。6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L 组合的 MS 培养基对不定芽分化最为有利,分化率可达 95.83%。分化后得到的不定芽在 6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.05 mg/L 的 MS 培养基上平均每外植体分化不定芽数达 5.86 个。适宜的生根培养基为 1/2MS+IBA 0.1 mg/L,生根率高达 100%。采用 2 步移栽法进行移栽时,第 1 次移栽以河沙为基质移栽成活率可达 96.67%,第 2 次移栽成活率 98%。

**关键词:**软枣猕猴桃;离体培养;茎段;培养基

**中图分类号:**S 663.403.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2011)15-0157-04

软枣猕猴桃(*Actinidia arguta*)为猕猴桃科猕猴桃属藤本植物,是当今世界新兴果树,在国际市场上享有很高声誉的珍贵野生果树之一<sup>[1]</sup>。适于我国东北地区栽培的软枣猕猴桃,果实酸甜适口、柔软多汁、美味独特,含有丰富的多种营养物质,适作多种食品饮料的开发利用<sup>[2]</sup>。由于富含多种人体必要的氨基酸、矿物质和维生素,具有多种医疗保健功效,同时也是城市绿化的好树种<sup>[3]</sup>。该树种人工栽培基本无病虫害发生,所以果实无任何污染,是理想的绿色食品和疗效食品,已成为当前一种价值高、发展前途广的野生果树<sup>[4]</sup>。软枣猕猴桃种子繁殖遗传变异大,采用常规无性繁殖法绿枝扦插<sup>[5]</sup>,繁殖速度慢,存在着繁殖系数低,占地面积大,受母株取材季节限制,影响优良品种的开发和规模化生产的需求。因此,利用组织培养技术是当前软枣猕猴桃优良种苗生产的主要途径和有效方法。目前,软枣猕猴桃品种很多,但真正各项性状都比较优秀的品种很少<sup>[6]</sup>。课题组在长白山一带资源考察过程中,发现了果实较大、酸甜适口、果皮红绿而无毛的野生软枣猕猴桃。为使这一优良品种存续下来,并快速应用于生产,对其进行了组织培养研究。关于软枣猕猴桃的组培研究虽有报道<sup>[1-2]</sup>,这些研究主要关注的是

组培过程中的一些技术问题,如外植体所产生的愈伤组织再分化能力方面。但前人研究的所得结论差异较大,如参数变幅大,植物激素和浓度不同等。该试验以长白山野生软枣猕猴桃茎段为外植体,对影响其组织培养快繁效率的多种激素因子和外植体所产生的不定芽、芽苗增殖及生根诱导等一系列问题进行了研究,筛选各培养阶段最佳培养基配方,建立了野生软枣猕猴桃组织培养高频植株体系。旨在为短期内获得大量种苗的大规模商业化生产提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

野生软枣猕猴桃,2009 年秋季,由延边大学农学院园艺系朴一龙副教授在长白山一带资源考察过程中发现的品种优良、大果野生软枣猕猴桃树,移植于试验果树农场基地内。试材为第 2 年早春该移栽树上的生长健壮、无病虫害新梢作外植体。

### 1.2 试验方法

将试验材料带回实验室,剪去叶片,切成 3~4 cm 的小段,用自来水冲洗干净,再用洗衣粉溶液浸泡 2~3 min,并用软毛刷洗腋芽基部,将刷洗后的外植体用流水冲洗 2 h,在无菌条件下,用 75%酒精消毒 15 s,无菌水冲洗 2 次,之后往 0.1%的升汞消毒 3 min,无菌水冲洗 5~6 次,然后将材料切成 0.5 cm 长的小段供接种用。

消毒后的茎段外植体接种于以 MS 为基本培养基,附加不同植物激素组成的 6 种芽分化培养基中,每天观察生长状况,培养 28 d 后调查芽分化情况,筛选出芽分化适宜培养基。将 3 种不同类型外植体分别接种在 MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L 培养基上培养 30 d,观察芽的分化及生长情况。

第一作者简介:朴一龙(1962-),男,吉林图们人,博士,现主要果树栽培研究工作。E-mail: piaoly@ybu.edu.cn。

责任作者:朴日子(1958-),女,吉林龙井人,高级实验师,现主要从事植物组织培养及园艺植物育种工作。E-mail: riziipiao@yahoo.com.cn。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31060254)。

收稿日期:2011-04-28

将外植体上萌发的嫩梢单个切下后,转入不同细胞分裂素和生长素组合的8种培养基上,培养30 d后,调查芽分化数及生长状况,统计增殖系数。以1/2MS为基本培养基,分别加入 IBA 0.05、0.1、0.2、0.3 mg/L 共4个处理,接种2~3 cm高的试管苗嫩茎进行生根培养,20 d后调查生根率和根系生长状况。移栽练苗基质采用河沙、腐殖土及珍珠岩,二者单独或者混合使用,15 d后统计幼苗成活率。

所有培养基均含蔗糖3%,琼脂0.8%,pH 5.8~6.0。培养温度为 $(25 \pm 2)^{\circ}\text{C}$ ,光照强度为1500~2000 lx,光照时间为14 h/d,每天进行观察。3次重复,取平均值,用SPSS 11.5统计软件对试验结果进行方差分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同培养基对外植体芽分化的影响

由表1可知,6种培养基配方均能诱导芽的分化,但芽的分化率和生长状态上有显著性差异。4号处理显著高于其它处理,接种4 d就可以看到芽萌动,28 d芽分化率达到了95.83%。次之是6号处理,芽分化率达87.50%。3号培养基上芽分化率最低,仅为41.67%。而从分化出的芽生长情况来看,6种培养基上分化出的芽生长状况也明显不同。4号培养基上芽生长状况最好,生长健壮,叶色绿。2号和6号培养基上分化出的芽叶色黄绿,1号、5号培养基上分化出的芽矮,叶小,长势很一般。在附加 $\text{GA}_3$ 的3号培养基上分化出的芽,畸形芽多,单叶未张开,后期出现芽枯死。总而言之,野生软枣猕猴桃芽诱导以4号培养基MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L的诱导效果最好。

表1 不同培养基对外植体芽分化的影响

处理	培养基组合 /mg · L <sup>-1</sup>	调查数 /个	开始萌发时间 /d	芽分化率 /%
1	ZT 1.0 + 6-BA 0.5 + NAA 0.02	24	7	62.50d
2	ZT 1.0 + NAA 0.1	24	6	83.33b
3	6-BA 0.5 + $\text{GA}_3$ 1.0	24	9	41.67e
4	6-BA 1.0 + NAA 0.5	24	4	95.83a
5	6-BA 2.0 + NAA 0.1	24	7	75.00c
6	6-BA 3.0 + NAA 0.5	24	5	87.50b

注:显著水平  $P \leq 0.05$ ,下表同。

### 2.2 不同外植体类型对芽分化的影响

由表2可看出,3种类型外植体均能诱导芽的分化,但诱导效果有差异显著。以侧芽的再生芽分化率显著高于其它处理。芽分化率高达93.33%,顶芽次之,芽分化率可达83.33%,最低的是无芽茎段外植体,芽分化率仅有30.00%。不论从芽萌发时间,还是芽生长状况来看,侧芽和顶芽作为外植体明显优于无芽茎段外植体。可能是不同外植体中细胞的分化程度不同,所以,脱分化和再分化难易程度也不同<sup>[6]</sup>。无芽茎段外植体通过脱分化先形成愈伤组织再形成芽,还需要一定的萌发时间,易产生遗传变异。这说明主要是由于在这些组织部位中分生组织的分布不同,其中生长迅速的顶芽、侧芽中均含有较多的分生组织,因此有

利于再生芽诱导。而与顶芽外植体相比,侧芽外植体更有利于芽分化效果,不仅芽分化率高,而且芽生长最为健壮,经30 d培养,平均株高4.78 cm,且芽苗叶片深绿而厚实,适宜进行不定芽的诱导。即野生软枣猕猴桃组织培养时选择侧芽作为外植体的分化效果优于顶芽。

表2 不同外植体类型对芽分化及生长的影响

外植体 类型	调查数 /个	开始萌发时间 /d	芽分化率 /%	芽生长状况
顶芽	30	4	83.33b	生长较好,芽苗高平均2.86 cm
侧芽	30	5	93.33a	生长健壮,芽苗高平均4.78 cm
无芽茎段	30	10	30.00c	生长一般,芽苗高平均1.04 cm

### 2.3 不同细胞分裂素对不定芽增殖的影响

试管苗的增殖率受培养基中细胞分裂素的控制。细胞分裂素可打破植物顶端优势促进侧芽的连续萌发从而提高增殖率<sup>[7]</sup>。该试验在增殖培养基上选取6-BA和ZT 2种细胞分裂素作为参试因子,它们对继代培养的增殖倍数、平均株高的影响结果见图1、2。结果表明,各处理之间明显不同。

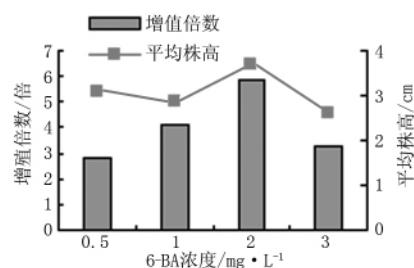


图1 6-BA处理对不定芽增殖的影响

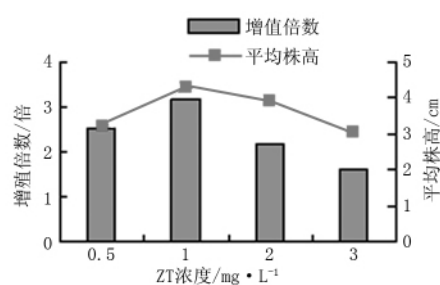


图2 ZT处理对不定芽增殖的影响

6-BA和ZT增殖倍数、平均株高都随浓度的升高先升高再降低。增殖倍数来看,6-BA处理优于ZT处理,当6-BA浓度为2.0 mg/L时的增殖倍数为5.86都高于其它处理。平均株高来看,ZT处理普遍优于6-BA处理,当ZT浓度为1.0 mg/L时,平均株高达到4.28 cm,也明显高于其它处理。但ZT处理的增殖倍数较低。根据试验过程观察,6-BA处理生长多为丛生苗,叶片正常,茎节较短,植株较正常(图3)。在ZT处理中,叶子偏大,茎节长、植株高,多为单苗,有少数丛生苗。比较2种细胞分裂素的处理结果,使用6-BA的处理优于ZT处理。综合上述研究结果,6-BA是野生软枣猕猴桃增殖生长阶段适宜的细胞分裂素类型,且

以 2.0 mg/L 浓度为宜。

#### 2.4 不同 IBA 浓度对试管苗生根的影响

从表 3 可看出,试管苗在附加不同质量浓度 IBA 的培养基上均能生根,并且生根率达 90% 以上。当 IBA 浓度在 0.05~0.2 mg/L 范围内,随着 IBA 质量浓度的提高,生根率也增加,浓度 0.1、0.2 mg/L 时生根率高达 100%。但当浓度达到 0.3 mg/L 时生根率为 91.67%,有较多的愈伤块。这说明 IBA 浓度抑制芽苗的生根。4 种处理的根系生长质量上,有显著性差异。质量浓度 0.1 mg/L 和 0.2 mg/L 相比,0.1 mg/L 处理显著高于 0.2 mg/L 处理,新梢生根时间最短 6 d,生成的根最多,平均有 7.69 条主根,根系也最长,平均有 2.69 cm。随着 IBA 质量浓度的增加,根系生长质量指标有下降趋势,新梢基部形成较多的愈伤组织,阻碍了根系的形成和生长,影响了移栽练苗的成活率。该研究中野生软枣猕猴桃试管苗生根培养最佳培养基为 1/2MS+IBA 0.1 mg/L。

表 3 不同 IBA 浓度对生根率及根系生长的影响

IBA /mg · L <sup>-1</sup>	调查数 /个	生根天数 /d	生根率 /%	根系生长状况		
				根条数 /个	根长 /cm	愈伤 组织块
0.05	24	8	95.83b	4.44c	1.81b	无
0.10	24	6	100.00a	7.69a	2.69a	无
0.20	24	7	100.00a	5.63b	1.19c	很少
0.30	24	7	91.67c	3.81d	1.63b	较多

#### 2.5 生根苗移栽及管理

先将生根试管苗的封口打开,在室内放置 1 d,取出幼苗后,洗净根上的培养基,移栽到 3 种不同练苗基质中,15 d 后统计 1 次成活率(表 4)。从表 4 可看出,河沙基质的移栽苗成活率最高达 96.67%,显著高于其它处理。次之是田土:珍珠岩的处理,即有 86.67%,比例为 1:2 的河沙。腐殖土基质移栽成活率最低,仅为 73.33%。这说明河沙基质透气性强,幼苗根系不易腐烂,从而表现出了良好的练苗效果。因此,试管生根苗最适宜的第 1 次练苗基质是河沙基质好。将成活的幼苗移到河沙:腐殖土(1:2)的花盆中,精心管理,幼苗生长迅速,木质化程度不断增加,移栽 20 d 的二次成活率可达 98%(图 4)。

表 4 不同基质对试管生根苗一次成活率的影响

基质	移栽苗数		成活率 /%
	/个	/个	
河沙	30	29	96.60a
田土:珍珠岩(1:2)	30	26	86.67b
腐殖土	30	22	73.33c

### 3 结论与讨论

植物组织培养中外植体芽的诱导不仅与生长调节剂的种类有关,而且与其组合浓度有关。大量研究表明,组织培养过程中细胞分裂素对不定芽诱导起作用,不同种类的细胞分裂素对不同材料的作用差异较大,但大多数种类以 6-BA 最为有效。在试验中,6-BA 比 ZT 更有利于不定芽的诱导。这与前人研究结果相似<sup>[1-2]</sup>。



图 3 野生软枣猕猴桃在瓶内增殖生长情况



图 4 野生软枣猕猴桃移栽花盆成苗情况

外植体再生能力不同早有报道,可能是不同外植体中细胞的分化程度不同,所以脱分化和再分化难易程度不同<sup>[4]</sup>。该研究中发现,侧芽和顶芽比无芽茎段容易脱分化和再分化,侧芽和顶芽相比,侧芽不仅材料消毒容易,萌发率也高,芽生长健壮而快,而且遗传性也稳定<sup>[8]</sup>。顶芽易形成愈伤组织,然后再分化不定芽,易产生遗传变异<sup>[9]</sup>。

周玲艳等<sup>[6]</sup>以芽段为材料,在与该试验培养的培养基上诱导不定芽,分化率为 100%,与该试验的结果不一致,原因可能是所用材料不同所致,周玲艳所用的材料是试管培养材料。2 种外植体所产生的分化能力方面有显著差别。可能与不同外植体来源不同,期内原激素水平不同有关。

激素是植物组织培养器官分化的关键因素,形成器官的类型由培养基中不同激素的相对浓度控制,而不是这些物质的绝对浓度决定<sup>[10]</sup>。侧芽是野生软枣猕猴桃离体培养的理想外植体,用 MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L 做培养基诱导产生不定芽,芽分化率达 95.83%。用 MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.05 mg/L 做不定芽的增殖培养基,增殖倍数达 5.86,用 1/2MS+IBA 0.1 mg/L 做培养基诱导生根,生根率达 100%。

#### 参考文献

- [1] 刘瑞林,张春来,孟黎明.软枣猕猴桃的组织培养[J].中国林副特产,2001(3):58.
- [2] 李昌禹,赵淑兰.软枣猕猴桃组织培养研究[J].特产研究,1998(1):19-21.
- [3] 朴一龙,赵兰花.软枣猕猴桃研究进展[J].北方园艺,2008(3):76-78.
- [4] 赵淑兰,李继海,屈慧鸽,等.软枣猕猴桃绿枝扦插繁殖及快速成苗试验[J].特产研究,1999(4):46-59.
- [5] 王晓春.软枣猕猴桃播种与嫁接育苗方法[J].特种经济动植物,

# 丝瓜 SRAP 反应体系的建立与优化

李莲芳, 郭 爽, 林鉴荣

(广州市农业科学研究院, 广东 广州 510308)

**摘 要:**以丝瓜基因组 DNA 为模板, 采用正交实验设计  $L_{16}(4^5)$ , 在 4 个水平上对影响丝瓜 SRAP 反应的 *Taq* 酶、 $Mg^{2+}$ 、模板、dNTP 及引物等 5 个因素进行了优化, 建立了丝瓜 SRAP-PCR 的最佳反应体系。利用 18 份丝瓜自交系材料来验证此反应体系, 均可扩增出清晰、可辨的条带, 可见该反应体系较稳定, 适用于丝瓜 SRAP 标记的扩增。

**关键词:**丝瓜; SRAP; 体系优化

**中图分类号:**S 642.403.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2011)15-0160-03

丝瓜 (*Luffa acutangula*) 为葫芦科 (Cucurbitaceae) 丝瓜属 (*Luffa*) 1 a 生攀缘性草本植物, 以嫩果供食用, 是深受人们喜爱的夏季蔬菜。在生产上分为普通丝瓜和有棱丝瓜 2 个栽培种, 在我国南北方均有栽培, 近年来栽培面积呈扩大趋势, 育种研究工作也得到深入开展, 新育成品种不断出现。但是, 丝瓜的分子生物学研究进展还比较缓慢。

SRAP 分子标记 (Sequence-related amplified

polymorphism, 序列相关扩增多态性) 是由 Li 和 Quries 开发的一种新的分子标记技术<sup>[1]</sup>, 该标记具有多态性高、信息量丰富、操作简便、重复性好、成本低等特点。目前已在葱<sup>[2]</sup>、番茄<sup>[3]</sup>、黄瓜<sup>[4]</sup>、油菜<sup>[5]</sup>等蔬菜作物中广泛应用。主要用于生物遗传多样性分析、基因定位、基因克隆、基因图谱构建以及比较基因组学等方面的研究。SRAP 标记是基于 PCR 的标记系统, 因此, PCR 反应体系中涉及的  $Mg^{2+}$ 、模板 DNA、*Taq* 酶、引物、dNTP 等的浓度均会影响扩增结果, 并最终影响 SRAP 标记结果。

该研究利用正交实验设计分析法<sup>[6]</sup>, 对 PCR 反应体系中几个主要影响因子进行了优化筛选, 建立了丝瓜 SRAP-PCR 的最佳反应体系, 以期对丝瓜 SRAP 分子标记、遗传多样性分析、基因定位、图谱构建等分子生物学方面的研究奠定基础。

**第一作者简介:**李莲芳(1968-), 女, 广东广州人, 高级农艺师, 现主要从事蔬菜育种研究工作。

**责任作者:**林鉴荣(1964-), 男, 研究员, 现主要从事蔬菜育种研究工作。

**基金项目:**广州市科技局资助项目(2010Z1-E381)。

**收稿日期:**2011-04-28

2010(3):41-42.

[6] 周玲玲, 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.

[7] 黄文江, 周守标, 阚显照, 等. 越橘属植物克隆的体外繁殖[J]. 中国野生植物资料, 2005(2):62-64.

[8] 王蒂. 植物组织培养[M]. 北京: 中国农业出版社, 2004(6):28-30.

[9] 崔澄. 植物激素与细胞分化及形态发生的关系[J]. 细胞生物学杂志, 1983, 5(2):1-5.

[10] 刘剑锋, 阎秀峰, 李霞, 等. 高山红景天叶片愈上组织诱导与植物再生[J]. 东北林业大学学报, 2007(2):33-34.

## Establishment and Optimization of the Tissue Culture System of Wild *Actinidia argula*

PIAO Yi-long, PIAO Ri-zi

(College of Agricultural, Yanbian University, Yanji, Jilin 133000)

**Abstract:** Stem segments were used as explants, the tissue culture system of the Changbai mountain wild *Actinidia argula* were established. To achieve an *in vitro* system, the hormone combination of 6-BA and NAA was compared with combination of ZT and NAA on the stem explants and the tube rapid propagation was studied. The results showed that the best explants was lateral buds; the appropriate media for generation was MS combined with 6-BA 1.0 mg/L and NAA 0.5 mg/L, the generation rates were 95.83%; The multiple of the adventitious bud multiplication was up to 5.86 cultured on MS with 6-BA 2.0 mg/L and NAA 0.05 mg/L. For rooting, the suitable media was 1/2 MS+IBA 0.1 mg/L and the rooting rate was 100%. The rooted plantlets were transplanted to substrata in two successive steps, the survival rates of which were 96.67% and 98% respectively.

**Key words:** *Actinidia argula*; tissue culture; media; stem segments