

狗枣猕猴桃叶片离体培养的研究

张玉杰¹, 杨忠², 顾德峰¹

(1. 吉林农业大学 园艺学院, 吉林 长春 130118; 2. 德惠市农业技术推广教育中心, 吉林 德惠 130300)

摘要:以狗枣猕猴桃叶片为外植体,研究了影响狗枣猕猴桃愈伤组织诱导、分化、试管苗生根的主要因素。结果表明:狗枣猕猴桃叶片诱导愈伤组织的最佳培养基为 MS+ZT 1.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L,诱导率达到 91.67%;不定芽分化的最佳培养基为 MS+ZT 2.0 mg/L+IBA 0.2 mg/L,分化率为 89.45%,平均出芽个数为 8.11 个;狗枣猕猴桃极易生根,在以添加不同质量浓度的 IAA、IBA 和 NAA 的 1/2MS 基本培养基上,生根率都很高,多数处理可达 100%;当基质配比 V(田园土):V(草炭):V(沙子)=1:1:1 时,试管苗的成活率为 92%。

关键词:狗枣猕猴桃;叶片;离体培养

中图分类号:S 663.4 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)10-0097-05

狗枣猕猴桃(*Actinidia kolomikta* (Maxim. et Rupr.) Maxim.) 属猕猴桃科 (Actinidiaceae) 猕猴桃属 (*Actinidia*) 大型落叶木质藤本,别名深山木天蓼、狗枣子(东北)、母猪藤、猫人参(安徽一带),是我国猕猴桃属中最耐寒的种类^[1-2]。狗枣猕猴桃是一种营养价值极高的水果,富含维生素 C、生物活性物质及多种微量元素,特别是其具有抗突变、抗畸变和抗肿瘤等作用。狗枣猕猴桃叶中含有大量的黄酮类成分,而黄酮类化合物是自然界中抗氧化作用最强的一类天然化合物,一直是人们致力于寻找新药的重要研究领域。因此,狗枣猕猴桃有可能作为预防与治疗心脑血管疾病的药物和保健食品应用^[3-7]。此外,它还是重要的园林绿化树种和珍贵的抗寒育种基因资源,开发利用潜力及科学研究价值都很大。我国野生狗枣猕猴桃资源过去相当丰富,但近十余年来破坏严重,浅山区狗枣猕猴桃资源已处于濒危状态^[8-9]。

自 1975 年以来,Hirsch^[10]首次以猕猴桃茎段为试材,进行离体培养,并对培养材料进行了氨基酸代谢的研究,为猕猴桃组织培养的研究工作揭开了序幕。我国的猕猴桃组织培养始于桂耀林^[11],之后有更多的研究人员从事此方面的研究,在猕猴桃的组织培养,如快繁、胚拯救、体细胞胚形成、花药培养获得单倍体、胚乳培养获得三倍体、原生质体培养及融合等方面取得了重要进展。但是,在狗枣猕猴桃器官快繁方面的研究很少,现

以狗枣猕猴桃叶片作为外植体进行组织培养,探讨狗枣猕猴桃叶片的最佳无性快繁再生体系,以期为野生种质资源保护、抗寒植物培育、研发新药及“药食同源”的保健食品提供基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

2012 年 6 月下旬,在长白山采集野生狗枣猕猴桃带叶片的新生枝条,放在水中培养,待用。

1.2 试验方法

1.2.1 灭菌时间及灭菌方法的选择 将狗枣猕猴桃叶片剪下,剔除卷曲、生病的叶片,放置流水下冲洗 1 h 后置于已经灭菌的小烧杯中,用无菌水冲洗 2 次,进行灭菌时间和方法的选择。设 2 种灭菌方法:采用 75%酒精浸泡 30 s,再用 0.1%升汞(HgCl₂)灭菌;直接用 0.1%升汞灭菌。升汞的灭菌时间梯度为 3、4、5 min。灭菌时要不断振荡,后立即用无菌水冲洗 6~8 次。接种 2 周后统计其污染率、褐变死亡率及成活率。

1.2.2 愈伤组织诱导与增殖 用无菌滤纸吸干叶片表面水分,将其切成 0.5 cm×0.5 cm 小块,叶面朝上接种到以 MS 为基本培养基的愈伤组织诱导培养基上,附加不同质量浓度植物生长调节剂 NAA(0.2 mg/L)、6-BA(2.0、3.0 mg/L)、ZT(1.0、2.0 mg/L)进行愈伤组织诱导增殖培养。每处理接种 24 块,3 次重复。

1.2.3 不定芽分化 将绿色颗粒状愈伤组织切成 0.4 cm×0.5 cm 的小块,转接到附加不同质量浓度植物生长调节剂的改良 MS 培养基上,诱导不定芽形成。每个处理接 11 瓶,每瓶接 3 块愈伤组织,3 次重复。

1.2.4 生根培养 将增殖培养所得的 2 cm 以上的健壮苗切割下来,分成单株转入生根培养基中,进行生根培

第一作者简介:张玉杰(1987-),女,黑龙江七台河人,硕士,研究方向为植物资源与种质创新。E-mail:1002097205@qq.com.

责任作者:顾德峰(1956-),男,吉林长春人,博士,教授,现主要从事野生植物资源的引种与驯化工作。E-mail:gu.df@163.com.

收稿日期:2014-01-15

养。以 1/2MS 为基本培养基,添加不同质量浓度的 IAA、IBA 和 NAA,研究不同激素浓度对狗枣猕猴桃生根的影响,以不添加任何激素的 1/2MS 培养基为对照(CK)。

1.2.5 练苗及移栽 将生根的组培苗培养瓶移到室外,打开瓶口,分别放置 1、3、5、7 d,以未经过练苗处理的组培苗为对照(CK)。练苗后取出小苗洗净根部培养基,分别移栽于田园土、V(田园土):V(草炭)=1:1 及 V(田园土):V(草炭):V(沙子)=1:1:1 的基质中,研究不同练苗时间和不同基质对狗枣猕猴桃成活率的影响。移栽后浇透水,加盖透光塑料薄膜。以后每天上午浇 1 次透水,1 周后,隔 1 d 浇 1 次透水,20 d 后调查其成活率。

1.2.6 培养条件 培养基 pH 5.8,琼脂条 10 g/L,蔗糖 30 g/L,培养温度(23±1)℃,光照强度 1 000~1 500 lx,光周期 14 h/10 h(光培养/暗培养)。

1.3 数据分析

试验数据均用 Excel 2003 和 SPSS 19.0 统计软件进行统计分析。出愈率=出愈外植体数/接种外植体数×100%;分化率=分化的外植体数/接种外植体数×100%;生根率=生根外植体数/接种外植体数×100%。

2 结果与分析

2.1 不同灭菌方法对狗枣猕猴桃外植体污染率的影响

从表 1 可以看出,随着消毒时间的增加,外植体的污染率呈下降趋势,褐变死亡率呈上升趋势,成活率呈先升后降的趋势。这是由于处理时间增加,有利于降低污染,但当处理时间超过一定限度时,会严重伤害植物

组织细胞,增加其褐变死亡率。总体上,用 75%酒精浸泡的外植体的成活率低于未经过 75%酒精浸泡的外植体,这可能是由于酒精渗透到叶片内破坏了植物细胞,增加了其褐变死亡率,但是对污染率的降低作用不大,因此应根据成活率、污染率和褐变死亡率综合考虑。就狗枣猕猴桃叶片来说,0.1%升汞处理 4 min 是最佳灭菌方式,污染率可以降到 25%,褐变死亡率 30%,而成活率达到 45%。

表 1 不同灭菌方法对狗枣猕猴桃外植体污染率的影响

Table 1 Effect of different sterilization methods on explants pollution rate of *Actinidia kolomikta*

灭菌方法 Sterilization method	污染率 Pollution rate/%	褐变死亡率 Browning and mortality rate/%	成活率 Survival rate/%
0.1% HgCl ₂ 3 min+75%酒精浸泡 30 s	40	35	25
0.1% HgCl ₂ 4 min+75%酒精浸泡 30 s	25	35	40
0.1% HgCl ₂ 5 min+75%酒精浸泡 30 s	20	50	30
0.1% HgCl ₂ 3 min	45	25	30
0.1% HgCl ₂ 4 min	25	30	45
0.1% HgCl ₂ 5 min	25	35	40

2.2 不同植物生长调节剂组合对愈伤组织诱导增殖的影响

狗枣猕猴桃叶片在接种至附加不同质量浓度的 6-BA、ZT、NAA 的 MS 培养基上后,经过 2 周培养,叶片均有明显变化(图 1),叶面褶皱,面积明显增大,叶片边缘和叶面局部开始产生愈伤组织,继续培养,7 周后调查愈伤组织的出愈率和生长状况(表 2)。由表 2 可知,叶片在不同培养基上愈伤组织的出愈率差异明显。在添



图 1 叶片接种 2 周后愈伤组织状态

Fig. 1 Callus status of inoculated leaves after two weeks

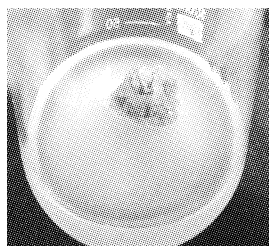


图 3 叶片接种 7 周后愈伤组织状态

(ZT 2.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L)

Fig. 3 Callus status of inoculated leaves after seven weeks



图 2 叶片接种 7 周后愈伤组织状态(6-BA 2.0 mg/L)

Fig. 2 Callus status of inoculated leaves after seven weeks

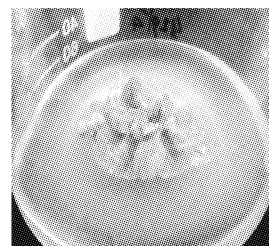


图 4 叶片接种 7 周后愈伤组织状态

(ZT 1.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L)

Fig. 4 Callus status of inoculated leaves after seven weeks

表 2 不同植物生长调节剂组合对愈伤组织诱导增殖的影响

Table 2 Effect of different combinations of plant growth regulators on callus induction and proliferation of <i>Actinidia kolomikta</i>						
处理 Treatment	激素质量浓度 Hormone concentration/mg · L ⁻¹			外植体个数 No. of explants/个	出愈率 Callus formation rates/ %	愈伤组织生长状况 Callus growth condition
	6-BA	ZT	NAA			
1	2.0	—	0.2	24	54.17c	愈伤组织浅黄色,粗糙,有少量类似球形胚产生
2	3.0	—	0.2	24	79.17b	愈伤组织鲜绿色,疏松,有球形胚产生,较少
3	—	1.0	0.2	24	91.67a	愈伤组织鲜绿色,疏松颗粒状,有大量球形胚产生
4	—	2.0	0.2	24	95.83a	愈伤组织生长较好,但培养一段时间后,褐化严重

注:不同小写字母表示各水平在 $P<0.05$ 水平差异显著。下同。
Note: Different lowercase indicate significant difference at the 5% level. The same below.

加 2.0 mg/L 6-BA 的培养基上产生粗糙浅黄色的愈伤组织,且愈伤组织出愈率低,仅为 54.17%(图 2),但是增加 6-BA 浓度为 3.0 mg/L 时,愈伤组织出愈率明显提高,达到 79.17%,高浓度的 6-BA 有助于愈伤组织诱导。在添加 ZT 的 MS 培养基上愈伤组织出愈率高,在诱导狗枣猕猴桃叶片愈伤组织生成时,激素 ZT 的效果好于 6-BA,但是合适的激素浓度和合理的激素配比是愈伤组织健康生长和减轻褐化的关键。当 ZT 2.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L 时,狗枣猕猴桃叶片愈伤组织诱导率最高,达到 95.83%,但是褐化严重(图 3);降低 ZT 浓度为 1.0 mg/L 时,此时的愈伤组织鲜绿色,疏松颗粒状,有大量球形胚产生(图 4),且出愈率高,达到 91.67%,为狗枣猕猴桃叶片愈伤组织诱导的最适培养基。

2.3 不同植物生长调节剂组合对愈伤组织分化的影响
将生长状态良好的愈伤组织接种到愈伤组织诱导培养基上(图 5),培养 4 周后愈伤组织体积明显增大且呈分化状态(图 6),6~7 周后形成丛生不定芽(图 7)。表 3 表明,在添加 2.0 mg/L 6-BA 的培养基上愈伤组织的分化率较低,平均出芽个数也较少,且芽苗长势不好;附加 2.0 mg/L ZT 的培养基上愈伤组织的分化率和平均出芽个数明显提高,在附加 ZT 2.0 mg/L+IBA 0.2 mg/L 的培养基上,愈伤组织的分化率达到 89.45%,平均出芽个数达到 8.11 个,为狗枣猕猴桃愈伤组织分化的最佳培养基。NAA 和 IBA 对愈伤组织分化无显著影响,但是细胞分裂素与生长素各自的质量浓度及二者的质量浓度比对愈伤组织的分化有一定的影响^[12]。



图 5 愈伤组织转入分化培养
Fig. 5 Callus changed into differentiation medium

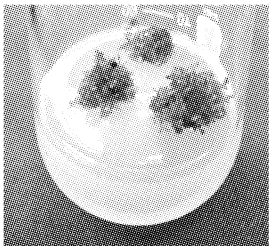


图 6 分化培养 4 周后愈伤组织分化状态
Fig. 6 Callus differentiation status after cultured four weeks

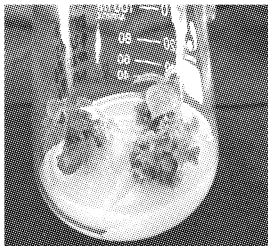


图 7 分化培养 6~7 周后愈伤组织分化状态
Fig. 7 Callus differentiation status after cultured six to seven weeks

表 3 不同植物生长调节剂组合对愈伤组织分化的影响

Table 3 Effect of different combinations of plant growth regulators on differentiation of callus of <i>Actinidia kolomikta</i>							
处理 Treatment	激素质量浓度 Hormone concentration/mg · L ⁻¹				接种愈伤组织块数 Vaccination callus blocks/块	分化率 Differentiation rate/ %	平均出芽个数 No. of shoots per explant/个
	6-BA	ZT	NAA	IBA			
1	2.0	—	0.1	—	33	70.56±4.19b	3.47±0.21d
2	2.0	—	0.3	—	33	50.00±4.17d	2.64±0.13e
3	2.0	—	—	0.2	33	60.19±5.25c	2.75±0.25e
4	2.0	—	—	0.4	33	60.19±5.78c	3.47±0.21d
5	—	2.0	0.1	—	33	88.66±3.13a	6.22±0.19c
6	—	2.0	0.3	—	33	81.57±3.04a	7.58±0.22b
7	—	2.0	—	0.2	33	89.45±3.85a	8.11±0.31a
8	—	2.0	—	0.4	33	85.46±4.78a	6.56±0.51c

注:表中数据为同一处理 3 次重复的平均值±标准差。下同。
Note: The datas in the table are mean ± standard deviation repeated 3 times in the same treatment. The same below.

2.4 不同植物生长调节剂组合对试管苗生根的影响

将继代增殖培养所得的健壮试管苗(图 8)进行生根培养。由表 4 可知,狗枣猕猴桃极易生根,各处理组合的生根率均达 95%以上,多数处理甚至达 100%(图 9、10),极强的生根能力在大多数植物中也是少见的。生长素对试管苗生根有一定的促进作用,添加生长素的生根培养基中试管苗开始生根的时间早,为 7~9 d,而在没有添加生长素的 1/2MS 培养基中试管苗 10~12 d 才开始生根,而且,添加生长素的生根培养基中试管苗的

生根率、平均根数和平均根长均有增加。从总体上看,添加 NAA 的生根培养基中试管苗的生根率、平均根数和平均根长均较理想;较高浓度的 IBA 有利于试管苗根的生成和生长,以 0.6 mg/L 为宜,当 IBA 的质量浓度达到 0.8 mg/L 时,试管苗中根的平均根数和平均根长下降;添加 IAA 的生根培养基中试管苗的平均根数随着 IAA 的浓度增加而增加,而平均根长先随着浓度的增加而增加,当浓度达到 1.0 mg/L 时,随着浓度的增加而降低。

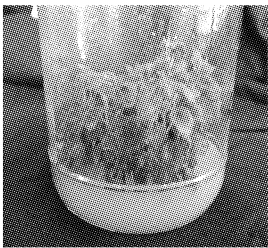


图 8 分化苗在增殖培养基中生长状态
Fig. 8 Growth status of seedling in proliferation medium

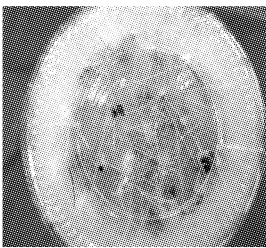


图 9 试管苗 20 d 生根状态
Fig. 9 Rooting condition of plantlets after twenty days

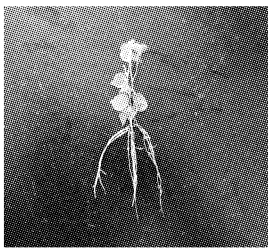


图 10 试管苗 20 d 生根状态
Fig. 10 Rooting condition of plantlets after twenty days

表 4 不同植物生长调节剂组合对试管苗生根的影响

Table 4 Effect of different combinations of plant growth regulators on rooting of tube seedlings of *Actinidia kolomikta*

处理 Treatment	激素质量浓度 Hormone concentration/mg · L ⁻¹			接种数 No. of explants/个	生根率 Rooting rate/%	平均根数 No. of roots per plant/条	平均根长 Average root length/cm
	IAA	IBA	NAA				
1	0	0	0	45	95.56	4.91±0.08j	2.49±0.04h
2	0.5	—	—	45	100.00	5.27±0.10i	3.35±0.06f
3	1.0	—	—	45	100.00	5.96±0.08h	4.32±0.02a
4	1.5	—	—	45	97.78	6.30±0.05g	2.63±0.02g
5	—	0.4	—	45	97.78	7.65±0.04d	3.64±0.02cd
6	—	0.6	—	45	100.00	7.96±0.08c	3.70±0.05bc
7	—	0.8	—	45	100.00	7.10±0.09f	3.49±0.04e
8	—	—	0.1	45	100.00	7.23±0.08e	3.44±0.18ef
9	—	—	0.3	45	100.00	8.33±0.03a	3.53±0.02de
10	—	—	0.5	45	100.00	8.10±0.09b	3.78±0.06b

2.5 练苗与移栽

将经过练苗处理的狗枣猕猴桃生根试管苗移栽入预先调配好的基质中(图 11),20 d 后调查其成活率。从表 5 可知,练苗时间对狗枣猕猴桃的移栽成活没有太大影响;基质不同,成活率显著不同。添加草炭和添加草炭沙子的基质的移栽苗成活率明显高于仅用田园土的

基质,V(田园土):V(草炭):V(沙子)=1:1:1 基质的移栽平均成活率,达到 92%,这可能与草炭和沙子的加入增加了土壤的透气性和土壤营养有关。加入沙子的基质一定要保证水分的供应,否则影响成活率。生根苗移栽 50 d 的生长情况如图 12 所示。



图 11 生根苗移栽
Fig. 11 The rooting seedling transplanting

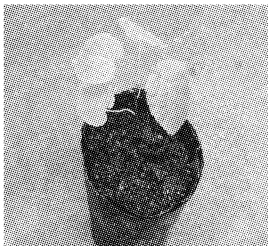


图 12 生根苗移栽 50 d 生长状态
Fig. 12 Growth state of rooting seedling transplanted for fifty days

表 5 不同练苗时间和不同基质对试管苗的移栽成活率的影响

Table 5 Effect of different exercising time and matrix on transplant survival rate of tube seedling of *Actinidia kolomikta* %

基质 Matrix	练苗时间 Time of exercising seedling/d					平均值 Average value
	CK	1	3	5	7	
田园土	80	60	90	50	80	72c
V(田园土):V(草炭)=1:1	80	90	90	90	100	90b
V(田园土):V(草炭):V(沙子)=1:1:1	100	90	90	100	80	92a

3 结论与讨论

以狗枣猕猴桃叶片作为外植体,在培养过程中污染较为严重,采用 75%酒精消毒又会增加叶片的死亡。该试验用 0.1%升汞灭菌 4 min,污染率可以降到 25%,但仍然很高,可以考虑在培养基中加入抗生素来控制污染,如青霉素、链霉素都是组培中常用的抗生素^[13]。植物生长调节剂种类和浓度对外植体的诱导和分化有较大影响^[14],ZT 是狗枣猕猴桃叶片愈伤组织诱导和分化的关键激素,以 1.0~2.0 mg/L 为宜。培养基 MS+ZT 1.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L 为狗枣猕猴桃叶片愈伤组织诱导的最佳培养基,诱导率达到 91.67%,愈伤组织鲜绿色,疏松颗粒状,且产生大量球形胚。狗枣猕猴桃叶片愈伤组织分化的最适培养基是 MS+ZT 2.0 mg/L+IBA 0.2 mg/L,此时,愈伤组织的分化率达到 89.45%,平均出芽个数高达 8.11 个。高浓度的 6-BA 有利于狗枣猕猴桃叶片愈伤组织的诱导和分化,可以通过提高 6-BA 的浓度来提高愈伤组织的诱导率和分化率。狗枣猕猴桃非常容易生根,以 1/2MS 为基本培养基,添加不同浓度的 IAA、IBA 和 NAA,多数处理的生根率达到 100%,与张喜春等^[15]的研究 IAA 为狗枣猕猴桃试管苗的最佳生根激素有很大不同。练苗时间对狗枣猕猴桃试管苗的移栽成活没有太大影响,基质种类显著影响试

管苗的成活率。V(田园土):V(草炭):V(沙子)=1:1:1 时,试管苗的成活率达到 92%。

参考文献

- [1] 朱有昌. 东北药用植物[M]. 哈尔滨:黑龙江科学技术出版社,1989:740-741.
- [2] 张继有,严仲铠. 长白山植物药志[M]. 长春:吉林人民出版社,1982:983.
- [3] 李平亚,赵春芳,刘金平. 猕猴桃的化学成分和生物活性研究进展[M]. 长春:吉林科学技术出版社,2006.
- [4] 李结维,毛世忠,梁木源,等. 猕猴桃属植物果实营养成分的研究[J]. 广西植物志,1995,15(4):377-382.
- [5] 常晓丽,马冰如,何玲. 狗枣猕猴桃叶化学成分的研究(D)[J]. 中草药,1993,24(6):283-285.
- [6] 常晓丽,陈仑,马冰如. 狗枣猕猴桃化学成分研究[J]. 中草药,1996,27(7):395.
- [7] 赵继红,梁宇,颜达予. 黄酮类化合物抗氧化活性的结构因素[J]. 北方工业大学学报,2001,13(1):36-42.
- [8] 吴怀恩,甄汉深,钟振国. 猕猴桃属植物的研究进展[J]. 中药材,2004,27(1):59-63.
- [9] 欧阳红涛,华卡,董建辉. 猕猴桃药理作用的研究进展[J]. 中国医药导报,2007,32(4):12-13.
- [10] Hirsch A M. The culture of *Actinidia chinensis* fruit tissues and the metabolism of free amino acids in Stem segments cultured *in vitro* [J]. Comptes Rendus Hebdomadaires des Seances de l'Academic des Sciences D, 1975,280(11):1369-1372.
- [11] 桂耀林. 猕猴桃离体茎段愈伤组织的诱导和植株再生[J]. 植物生理学通讯,1979,21(4):339-343.
- [12] 朱俊义,夏广清,刘雪莲,等. 东北刺人参组培快繁及种质保存技术[J]. 东北林业大学学报,2007,35(11):9-10.
- [13] 刘金英,徐有明,李双来,等. 佛手山药组织培养的研究[J]. 植物研究,2006,26(3):323-237.
- [14] 李瑞芬,张敬原,赵茂林. 结缕草愈伤组织诱导及植株再生[J]. 园艺学报,2003,30(3):355-357.
- [15] 张喜春,吴绛云. 狗枣猕猴桃叶片植株再生及无性系快速繁殖[J]. 北方园艺,1990(9):7-9.

Study on *in vitro* Culture of *Actinidia kolomikta* Leaves

ZHANG Yu-jie¹, YANG Zhong², GU De-feng¹

(1. College of Horticulture, Jilin Agricultural University, Changchun, Jilin 130118; 2. Dehui City Agricultural Technology Education Center, Dehui, Jilin 130300)

Abstract: Effect of different combinations of plant growth regulators on callus induction, differentiation and rooting of the test tube seedlings were studied by using leaves of *Actinidia kolomikta* as explants. The results showed that the optimal medium for callus inducement from leaf was MS+ZT 1.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L, and callus inducement rate reached 91.67 percent; the best medium for differentiation of adventitious buds was MS+ZT 2.0 mg/L+IBA 0.2 mg/L, and the differentiation rate was 89.45 percent with an average number of 8.11 budding. *Actinidia kolomikta* was extremely easy to rooting, and to add different concentrations of IAA, IBA and NAA on 1/2MS medium, rooting rate were very high, and most even achieved 100 percent; as matrix consisted of garden soil, peat and sand by a volume ratio of 1:1:1 cultures the test tube seedlings, the survival rate was 92 percent.

Key words: *Actinidia kolomikta*; leave; culture *in vitro*