

“三峡虹”红阳猕猴桃组织培养体系的筛选

甘丽萍, 阮神清, 曾晓琳

(重庆三峡学院 生命科学与工程学院, 重庆 404100)

摘 要:以红阳猕猴桃叶片、嫩茎、花蕾为外植体, MS 为基本培养基, 设置不同外植体消毒方法、不同的激素配方进行组织培养, 比较了不同消毒剂对外植体的消毒效果、愈伤组织、不定芽的诱导情况, 以及形成愈伤组织能力较强的外植体种类。结果表明: 用 75% 酒精处理外植体 30 s, 再以 1% NaClO 消毒 10 min, 消毒效果达 75.0%; 诱导愈伤组织最适培养基为 MS+1.0 mg/L ZT+0.1 mg/L NAA; 诱导不定芽最适培养基为 MS+1.0 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA; 用嫩茎作为外植体, 诱导愈伤组织效果最好。

关键词:红阳猕猴桃; 组织培养; 愈伤组织

中图分类号:S 663.403.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2016)09-0114-04

红阳猕猴桃(*Actinidia chinensis* cv. Hongyang)属于中华猕猴桃系列^[1]。“三峡虹”红阳猕猴桃产自优质猕猴桃生长的最佳生态区——中国长江三峡中高山地区。其优良性状表现在将鲜果横切, 从果心向四周有艳丽的紫红色线条呈放射状分布, 就像太阳光芒四射。重庆市大山农业开发有限公司坐落于重庆万州, 主要致力于红阳猕猴桃种植及产业化开发。自 2003 年开始建设种植基地以来, 红阳猕猴桃种植共完成逾 400 hm² 的基地建设。通过嫁接方式获得种苗的速度不能满足日益扩大的种植规模, 扦插生根猕猴桃是一种简便易行、多快好省的培育优良苗木的方法^[2], 但扦插难度有很大差异^[3-4]。组织培养不但可以减少成本, 而且也保持种性、实现周年供苗以及推广该品种奠定了基础。但组织培养有较强的特异性, 不同植物、不同外植体、不同激素处理都会有不同的结果^[5-6], 为了筛选出适合“三峡虹”猕猴桃的组培条件, 现对比调查了不同消毒处理对外植体的杀菌效果和毒害影响; 设置不同的激素配比以供筛选出最佳愈伤组织和生根培养的培养基, 并比较了不同外植体进行愈伤组织诱导的能力。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料“三峡虹”红阳猕猴桃的叶片、嫩茎和花蕾由重庆市大山农业开发有限集团公司提供。

供试试剂: 基本培养基 MS 的各种母液、ZT、NAA、琼脂、蔗糖、0.05% HgCl₂、0.1% HgCl₂、1% NaClO(有效

氯), 2% NaClO(有效氯), 1 mol/L HCl、1 mol/L NaOH。

供试仪器: GXZ-270D 智能光照培养箱、恒温干燥箱、电子天平、全自动灭菌器、双管蒸馏器、超净工作台。

1.2 试验方法

1.2.1 外植体消毒方法的筛选 在自来水下流水冲洗外植体 1 h, 放入超净工作台上, 先用无菌水冲洗 3 次, 再用 75% 的酒精浸泡 30 s, 无菌水清洗 3 次, 接着分别用设置的 8 组不同消毒方法①1% NaClO; ②2% NaClO; ③0.05% HgCl₂; ④0.10% HgCl₂; ⑤1% NaClO+0.05% HgCl₂; ⑥1% NaClO+0.10% HgCl₂; ⑦2% NaClO+0.05% HgCl₂; ⑧2% NaClO+0.1% HgCl₂, 进行表面消毒 10 min(需要不断震荡, 且 2 种消毒剂配比的消毒方法需分别进行消毒, 2 种消毒剂交换过程中需用无菌水清洗 3 次), 最后用无菌水清洗 3 次, 将消毒处理过后的叶片用无菌滤纸吸干水分, 在叶片主脉附近, 切取 5 mm 的小方块^[7], 接种到愈伤组织诱导培养基上。置于人工调节气候箱中培养, 温度为(25±2)℃, 光照时间为 16 h/d, 光照强度为 3 300 lx。每种消毒方法接种 12 个外植体。接种后, 定期观察记录外植体的污染数、褐化数和生长情况。以污染率、褐化率为指标计算消毒效果, 消毒效果(%)=[1-(污染率+褐化率)/2]×100。

1.2.2 诱导愈伤组织培养基的筛选 以 MS 为基本培养基, 相同 NAA 浓度下, 设置不同 ZT 浓度。A1: 0.5 mg/L ZT+0.1 mg/L NAA; A2: 1.0 mg/L ZT+0.1 mg/L NAA; A3: 1.5 mg/L ZT+0.1 mg/L NAA; A4: 2.0 mg/L ZT+0.1 mg/L NAA; 将筛选出的配方中的 ZT 替换为 6-BA 进行细胞分裂素的比较。培养基中分别附加 7 g/L 琼脂和 30 g/L 蔗糖, pH 值调节为 5.8~6.0; 培养温度为(25±2)℃, 光照强度为 3 300 lx, 光照时间为 16 h/d。

第一作者简介:甘丽萍(1979-), 女, 博士, 副教授, 现主要从事植物生理及生物技术等研究工作。E-mail: ganmei790717@163.com。

收稿日期:2015-12-23

观察和记录愈伤组织的形成情况。

1.2.3 诱导不定芽培养基的筛选 将 30 d 后产生的愈伤组织接种在不同激素配比的诱导不定芽的培养基中。以 MS 为基础培养基,设置不同激素浓度配比。B1: 0.5 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA,B2:1.0 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA,B3:1.5 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA,B4:2.0 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA;培养基中分别附加 7 g/L 琼脂和 30 g/L 蔗糖,pH 值调节为 5.8~6.0;培养温度为(25±2)℃,光照强度为 3 300 lx,光照时间为 16 h/d。观察和记录不定芽的分化情况。

1.2.4 不同外植体愈伤组织形成能力比较 以猕猴桃幼嫩叶片、花蕾和嫩茎段为外植体材料,以 1.2.2 筛选出的最适愈伤组织培养基(A2:1.0 mg/L ZT+0.1 mg/L NAA)进行愈伤组织形成能力比较。培养基中分别附加 7 g/L 琼脂和 30 g/L 蔗糖,pH 值调节为 5.8~6.0;培养温度为(25±2)℃,光照强度为 3 300 lx,光照时间为 16 h/d。观察和记录愈伤组织的形成情况。

表 1 猕猴桃外植体不同消毒方法效果比较

Table 1 The different disinfection methods of explants of *Actinidia chinensis* cv. Hongyang

消毒方法	消毒时间/min	接种数/个	污染数/个	褐化数/个	污染率/%	褐化率/%	消毒效果/%
①1% NaClO	10	12	3	3	25.0	25.0	75.0
②2% NaClO	10	12	3	6	25.0	50.0	62.5
③0.05% HgCl ₂	10	12	4	3	33.3	25.0	70.8
④0.10% HgCl ₂	10	12	1	9	8.3	75.0	58.3
⑤1% NaClO+0.05% HgCl ₂	10	12	5	4	41.7	33.3	62.5
⑥1% NaClO+0.1% HgCl ₂	10	12	2	3	16.7	25.0	79.2
⑦2% NaClO+0.05% HgCl ₂	10	12	6	9	50.0	75.0	37.5
⑧2% NaClO+0.1% HgCl ₂	10	12	8	12	66.7	100.0	16.7

2.2 诱导愈伤组织激素配方的筛选

接种 15 d 后,4 种激素培养基处理的外植体有不同程

表 2 不同激素配方诱导愈伤组织能力比较

Table 2 The callus induction effect of different hormone formulations of *Actinidia chinensis* cv. Hongyang

编号	激素浓度/(mg·L ⁻¹)	接种数	形成的愈伤组织/个	分化率/%	愈伤组织形状
A1	0.5	30	2	6.6	叶片扩大,四周形成了愈伤组织,均呈绿色,较致密
A2	1.0	30	6	20.0	
A3	1.5	30	3	10.0	
A4	2.0	30	1	3.3	

1.3 数据分析

采用 Excel 和 SPSS 20.0 统计分析软件处理数据。

2 结果与分析

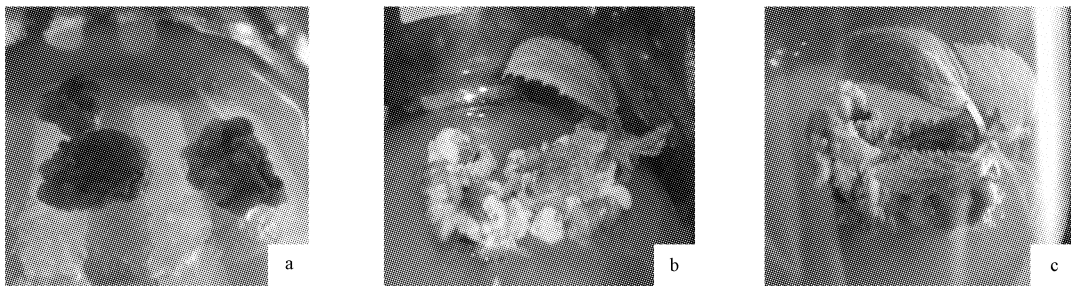
2.1 外植体不同消毒方法效果比较

不同的消毒方法对外植体的消毒效果有较大差异。消毒过程中除消除外植体表面的微生物外,对外植体本身也有一定影响。从表 1 可以看出,综合消毒效果最好的为处理 ⑥:1% NaClO+0.1% HgCl₂,污染率为 16.7%,褐化率为 25.0%,消毒效果达到 79.2%;1% NaClO 的消毒效果次之,为 75.0%。表面消毒效果(只看污染率)最好的消毒方法为 0.1% HgCl₂,但其褐化率高达 75.0%,使得外植体无法正常诱导形成愈伤组织;在①、②、③、④单消毒剂中:污染率①=②,③>④,说明高浓度的消毒剂灭菌效果更好;而褐化率①<②,③<④,说明低浓度的消毒剂对外植体的伤害更小。

度的愈伤组织形成,A2 培养基为最适合于诱导愈伤组织形成,出愈率最高,达到 20.0%。愈伤组织在叶片的四周形成,均呈绿色,较致密。形成愈伤组织的能力顺序为 A2>A3>A1>A4。利用 1.0 mg/L 6-BA 代替 1.0 mg/L ZT 与 A2 进行对比,发现 1.0 mg/6-BA 诱导出的愈伤组织较少。

2.3 诱导不定芽激素配方的筛选

将已经形成的愈伤组织转接在诱导不定芽培养基上 7 d 左右,愈伤组织上出现了许多绿色突起(图 1a),20 d



注:a.接种后 7 d;b.接种后 20 d;c.接种后 30 d。

Note:a. 7 days after inoculation;b. 20 days after inoculation;c. 30 days after inoculation.

图 1 愈伤组织诱导不定芽过程

Fig. 1 The bud induction from callus of *Actinidia chinensis* cv. Hongyang

表 3 不同激素的诱导不定芽情况

Table 3 The bud induction ability of different hormone formulations of *Actinidia chinensis* cv. Hongyang

编号	激素浓度/(mg·L ⁻¹)		接种数	形成愈伤组织数/个	分化率/%	愈伤组织形状	
	6-BA	NAA				7 d 左右	30 d 左右
B1	0.5	0.1	10	1	10.0	茎段的愈伤	不定芽展开 3~4 片嫩叶
B2	1.0	0.1	10	5	50.0	组织上出现	
B3	1.5	0.1	10	2	20.0	了许多绿色	
B4	2.0	0.1	10	1	10.0	突起	

左右有带叶片的不定芽长出(图 1b),30 d 左右不定芽展开 3~4 片嫩叶(图 1c);由表 3 可知,B2 培养基最适合诱导不定芽产生,分化率最高,达 50.0%。叶片形成的愈

伤组织不定芽的产生比茎段慢。

2.4 不同外植体愈伤组织和芽分化率形成能力比较

猕猴桃不同器官和组织形成愈伤组织的能力有差异(图 2)。从表 4 可知,使用同一种培养基(A2)对不同的外植体进行诱导培养,嫩茎的出愈率最高,达到 80.0%,芽分化率达到 37.5%。叶片次之,分别达到了 70.0%和 37.5%。花蕾出愈率达到了 60.0%,但在诱导不定芽培养基中无法分化出不定芽,说明该激素配比无法满足花蕾的要求,需要继续筛选。



注:a. 叶片;b. 花蕾;c. 嫩茎。

Note:a. Leaf;b. Stems;c. Buds.

图 2 不同外植体形成的愈伤组织

Fig. 2 The callus from different explants of *Actinidia chinensis* cv. Hongyang

表 4 不同外植体的愈伤组织诱导效果

Table 4 The callus induction effect of different explants of *Actinidia chinensis* cv. Hongyang

外植体	接种数		出愈数		出愈率		接种愈伤数		芽分化数		芽分化率	
	/个	/个	/个	/个	/%	/%	/个	/个	/个	/个	/%	/%
叶片	20	14	70.0	14	5	35.7						
花蕾	20	12	60.0	12	0	0.0						
嫩茎	20	16	80.0	16	6	37.5						

3 结论与讨论

该试验对红阳猕猴桃组织培养体系进行了筛选。用不同的消毒方法处理外植体,1% NaClO 与 0.1% HgCl₂ 配合使用来消毒效果最好,为 79.2%,1% NaClO 也取得较好的消毒效果,为 75.0%。升汞消毒灭菌效果好,但是残留量大^[8],接种后影响外植体正常生长,所以清洗次数要增加,对人也有很强的毒性,而 NaClO 是通过分解出的氯气进行杀菌,对植物无害^[6]。因此,从操作难易、对外植体伤害程度以及安全角度考虑,该试验用 75%酒精处理 30 s 后,以 1% NaClO 消毒 10 min 的方法代替配合使用的方法。诱导愈伤组织培养基为 MS+1.0 mg/L ZT+0.1 mg/L NAA,使用适合浓度的 ZT 能够诱导较好的愈伤组织,且能够使幼嫩茎段一次形成无根苗,而使用 6-BA 诱导愈伤组织效果不明显,这与谢志兵等^[9]认为 ZT 对猕猴桃愈伤组织的增殖、分化

有促进作用一致,但与樊军锋等^[10]高浓度的 6-BA 能够代替 ZT 诱导猕猴桃的愈伤组织形成不一致,这可能与品种相关。诱导不定芽最适合的培养基为 MS+1.0 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA,嫩茎的诱导效果最明显,而叶片诱导出现异常芽且形态分化极度缓慢,可能是激素浓度配比不适造成的结果。将嫩茎作为外植体,诱导愈伤组织和分化效果最好,分别为 80.0%和 37.5%,这与大多数学者研究结果一致^[11],如果以花蕾进行诱导培养,还需要具体的培养基筛选研究。

参考文献

- [1] 文国琴,何震. 红心猕猴桃茎段愈伤组织诱导成苗技术[J]. 福建林业科技,2004,31(4):78-79.
- [2] 王玉霞,张超. 猕猴桃扦插后的管理[J]. 柑桔与亚热带果树信息,2004,20(9):17.
- [3] 杨清平,艾秀兰. 猕猴桃扦插繁殖试验[J]. 农业与技术,2001,21(3):23-25.
- [4] 隆前进,吴延军,谢鸣. ‘红心’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.
- [5] 杨柯金,于相丽,郝薇薇. 猕猴桃组织培养研究进展[J]. 安徽农业科学,2006,34(13):3015-3017.
- [6] 陈正华. 木本植物组织培养及其应用[M]. 北京:高等教育出版社,1986:30-31.
- [7] 丁士林,朱秀珍,余厚敏. 美味猕猴桃的组织培养[J]. 中国果树,1997(2):27-29.
- [8] 李永文,刘新波. 植物组织培养技术[M]. 北京:北京大学出版社,2007:39.

不同甜瓜材料苗期细菌性果斑病抗性鉴定

张 亮¹, 王惠林^{1,2}, 万秀琴¹, 郑 健²

(1. 新疆农业大学 林学与园艺学院, 新疆 乌鲁木齐 830052; 2. 国家瓜类工程研究中心, 新疆 昌吉 831100)

摘 要:以 25 份不同甜瓜材料为试材, 采用苗期喷雾接种法, 分析研究了不同甜瓜材料对果斑病的抗性, 为甜瓜抗病性育种提供参考。结果表明: 筛选出 T1、T4、T11 等中抗材料 8 份, 中感材料 8 份, T6、T12、T13 等感病材料 9 份, 没有免疫和高抗材料; 另外, 田间植株表现病害的 T12、T13、T20 等材料均属于中感或感病级别。T1、T4 等抗性较高材料与 T6、T12 等感病材料抗病指数有明显的差异。

关键词:甜瓜; 细菌性果斑病; 抗病性鉴定

中图分类号:S 652.603.7 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2016)09-0117-04

细菌性果斑病菌可侵染甜瓜生长的整个时期, 导致甜瓜叶片枯萎和果实腐烂。一旦发病, 用药防治基本没有效果, 同时导致种子带菌, 成为下一年重要的初侵染源^[1]。该病害已成为我国瓜类生产的重要病害之一。目前, 由于细菌性果斑病导致瓜类商品的经济效益严重下降, 对瓜类产业造成了威胁, 因此, 必须采取有效的措

施防治该病害的发生, 生产实践和研究结果表明, 利用抗性强的品种是最经济、最有效的控制该病的措施^[2]。现通过室内苗期喷雾接种法, 对 25 份甜瓜材料进行抗性鉴定, 以期对甜瓜抗病性育种提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

25 份供试甜瓜材料编号为 T1~T25, 其中自交系材料 20 份(T1~T20), 杂交一代材料 5 份(T21~T25), 由国家瓜类工程技术研究中心提供, 详见表 1。供试的细菌性果斑病菌株由南京农业大学提供, 菌株代号为 M2。

1.2 试验方法

1.2.1 病原菌悬浮液的制备 果斑病菌的扩繁活化采

第一作者简介:张亮(1989-), 男, 硕士研究生, 研究方向为甜瓜遗传育种。E-mail:514086991@qq.com.

责任作者:王惠林(1968-), 男, 硕士, 副教授, 硕士生导师, 研究方向为瓜类育种。E-mail:wanghuilin@qq.com.

基金项目:国家科技支撑计划资助项目(2014BAD01B0805)。

收稿日期:2015-12-16

[9] 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.

[10] 樊军锋, 李玲, 韩一凡, 等. 秦美猕猴桃叶片再生最佳系统的建立[J].

西北植物学报, 2002, 22(4): 907-912.

[11] 陈洪国, 熊月明. 不同外植体和生长调节剂对猕猴桃愈伤组织形成与再分化的影响[J]. 福建果树, 2001(4): 3-4.

Tissue Culture System Screening of *Actinidia chinensis* cv. Hongyang 'Sanxia Horg'

GAN Liping, RUAN Shenqing, ZENG Xiaolin

(College of Life Science and Engineering, Chongqing Three Gorges University, Chongqing 404100)

Abstract: Taking the leaf, stems, buds of Hongyang kiwi fruit as explants, MS as basic medium, the effect of different disinfection methods, callus and bud induction ability of hormone formulations was studied. The results showed that the disinfectant method of 75% alcohol treatment explants 30 s, then 1% NaClO disinfection 10 min was the best with sterilizing effect reached 75.0%; callus optimum medium was MS+1.0 mg/L ZT+0.1 mg/L NAA while optimum medium for inducing adventitious buds was MS+1.0 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA. The stems was the best explants for callus formation.

Keywords: *Actinidia chinensis* cv. Hongyang; tissue culture; callus