

# 猕猴桃的组织培养及繁殖能力的研究\*

汪建亚 河野耕藏

**摘要** 以猕猴桃的顶芽作外植体进行离体培养,芽分化率最高,为 79.1%,其次是侧芽和茎段,两者的芽分化率分别可达 45.8% 和 24.4%,叶片的芽分化率为 0。以顶芽为外植体,在添加 1.5 mg/L BAP 和 0.2 mg/L NAA, N 素减半的改良 MS 培养基上进行芽分化和继代培养,芽分化率可达到 97.7%,在继代培养中补充 10 mg/L 的谷氨酸盐,可大大提高继代增殖系数  $\beta$ ,到第三次继代时,  $\beta$  可达到 127.5,而此时对照的  $\beta_1$  仅为 12.7。以 N 素减半或 N 素及 Fe 盐减半的 MS 培养基作生根培养基,生根率均可达 100%,比对照提高 30%,平均根长分别比对照长 4.2 cm 和 7.1 cm,开始生根时间分别比对照早 3 d 和 6 d;在生根培养基上添加 3% 的活性炭可以进一步提高生根长度,缩短生根时间。研究认为繁殖系数  $\epsilon$  是衡量一个外植体可繁殖成多少苗木的主要指标,本试验中  $\epsilon = 101$ ,即一个外植体可繁殖 101 棵苗。

**关键词** 猕猴桃 组织培养 培养基 繁殖系数

猕猴桃(*Actinidia chinensis* Pl)是原产我国的野生藤本果树,属猕猴桃科(Actinidiaceae)猕猴桃属(*Actinidia*)。在猕猴桃属 70 多个品种中,目前广泛栽种的仅有几种<sup>[1]</sup>。长江三峡猕猴桃是湖北省特有的品种之一,是湖北省宝贵的种质资源,其果实中维生素 C 的含量高于中华猕猴桃和美味猕猴桃<sup>1)</sup>。丁士林等<sup>[2]</sup>、朱道街<sup>[3]</sup>、刘翠云等<sup>[4]</sup>曾对美味、软枣、哑特猕猴桃的组织培养方法进行了研究。为进一步提高组织培养的繁殖系数,降低成本,作者对继代培养中添加有机物谷氨酸盐作了研究,特别是对前人未系统研究过的衡量繁殖能力大小的指标进行了较深入研究。现报道如下。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料的处理

原始外植体选自生长于湖北省林木种苗管理站苗圃的 8 年生长江三峡猕猴桃优株。在 11 月份,选取健康、生长旺盛的当年生新梢,长约 30 cm,粗 1 cm 的枝条(含顶芽或侧芽),放入 100 mg/kg 浓度的 BAP 溶液里,在室内浸泡 3 个星期。每星期换水 1 次,至重新萌芽。剪取新萌芽条,先用清水反复冲洗 2~3 次,然后用 70% 的酒精消毒 2 min,再用 6% 的双氧水消毒 15 min。由于猕猴桃叶、茎段及芽有很多毛,要边消毒边用磁力搅拌器搅拌。最后再用无菌水冲洗 3~4 遍。

### 1.2 接种及培养

所有供试的培养体均接种在 250 mL 的三角瓶中,放在温度为 24~26 °C、光照强度为

1998—01—02 收稿。

汪建亚工程师(湖北省林木育种中心 武汉 430079);河野耕藏(日本林木育种中心长驻湖北专家)。

\* 本项目为日本政府无偿援助中国的专项技术合作项目,合作时间 1996~2001 年。

1) 湖北省林业厅. 湖北省林木种质资源. 1993.

3 000 lux, 每日光照时间为 15 h 的培养室中培养。

原始外植体经接种培养后, 剔除发霉和不开发的, 选取已萌发并形成内生愈伤组织的培养体作试验材料, 继续继代培养。

### 1.3 培养基的制备

实验以 BTM<sup>[5]</sup>、GD<sup>[6]</sup>、MS<sup>[7]</sup> 以及改良 MS 为基本培养基, 分化试验补加 1.5~2.5 mg/L BAP、0.2 mg/L NAA 以及 0.1 mg/L IBA、1.5 mg/L IAA 等, 在继代培养中补加谷氨酸盐 (Glutamine) 12 mg/L 以及琼脂 0.8%, 蔗糖 3%。生根试验补加 0.1 mg/L NAA、活性炭 3% 以及琼脂 0.8%、蔗糖 3%, 培养基的 pH 值均调至 5.8, 按常规法消毒。

### 1.4 繁殖系数的计算

全部试验重复 3 次, 观测值取平均值。为衡量一个外植体在一年中繁殖能力的大小, 作者提出了繁殖系数( $\epsilon$ )这个概念。 $\epsilon = \beta_1 \times \beta_2 \times F$

$$(1) \beta_1 = K_1 \times b \quad (b = a_1 \times a_2 \times a_3 \times \dots \times a_i \dots \times a_n, n \text{ 为继代培养次数})$$

$$(2) K_1 = h_1 \times (1 - f_1)$$

$$(3) \beta_2 = K_2 \times e$$

$$(4) K_2 = h_2 \times (1 - f_2)$$

$$\text{总算式: } \epsilon = h_1 \times (1 - f_1) \times (a_1 \times a_2 \times a_3 \times \dots \times a_i \dots \times a_n) \times h_2 \times (1 - f_2) \times e \times F$$

式中  $\beta_1$  为继代增殖系数,  $\beta_2$  为生根增殖系数,  $\beta_1$ 、 $\beta_2$  反映继代或生根培养时增殖的大小, 其数值越大, 说明增殖效果越好;  $a_i$  为每次继代的增殖率;  $b$  为多次继代的增殖率;  $K_1$  为继代培养中的环境影响,  $K_2$  为生根培养中的环境影响, 主要是指在操作过程中人为及设备因素造成的污染及对苗木质量的影响;  $h_1$  为继代培养的壮苗率,  $h_2$  为生根培养的壮苗率;  $f_1$  为继代培养的污染率,  $f_2$  为生根培养的污染率;  $e$  为生根率;  $F$  为健化成苗率。

## 2 结果和分析

### 2.1 不同外植体对芽分化的影响

顶芽和侧芽在接种一周内, 体积增长缓慢, 一周后增长加快, 18 d 后, 有的侧芽出现延长生长, 逐渐形成独苗。接种 21 d 后, 顶芽和侧芽开始分化, 在原来的芽体上形成了丛生芽, 芽的数量从 3 到 11 个不等。从顶芽和侧芽的分化情况来看, 两者的分化率相差很大, 在相同的培养基上, 顶芽的分化率为 79.1%, 侧芽的分化率为 45.8%。不同外植

表 1 不同外植体的分化情况

项 目	外植体种类			
	顶芽	侧芽	茎段	叶片
接种材料数(个)	86	120	120	52
产生愈伤组织的材料数(个)	8	75	36	8
产生芽分化的材料数(个)	68	55	11	0
芽分化率(%)	79.1	45.8	24.4	0

注: 培养基为 MS+ 1.5 mg/L BAP+ 0.2 mg/L NAA + 3% 蔗糖。

体的分化情况从表 1 可以看出, 在本试验的条件下, 外植体的分化能力以顶芽为最高, 其次为侧芽, 再次为茎段, 叶片未出现芽分化。从大量繁殖的目的来看, 顶芽不仅分化率高, 且容易成苗, 在遗传上又能保持母本的优良特性, 因而做试材最为理想。

### 2.2 不同激素对芽分化的影响

以顶芽为试材, 在 MS 中补加不同激素, 以探讨激素对芽分化的影响。结果从表 2 可以看出, 激素对芽的分化起重要作用。在不含激素的培养基上, 材料不能分化, 仅有部分出现生长,

且两周后, 逐渐黄化枯死。在含激素培养基上, 材料出现了不同程度的分化和生长。其中, NAA 效果比较好, 只要含量适当, 就能获得较高的分化率。IAA 诱导分化的效果较差。IAA 是一种天然生长素, 不稳定容易分解, 效果欠佳。以 BAP 与 NAA 组合比较好。但 BAP 含量过高时, 分化效果明显降低, 当 BAP 的含量为 2.5 mg/L 时, 分化率仅为 10% ~ 30%, 以 1.5 mg/L BAP 和 0.2 mg/L NAA 组合效果比较理想, 分化率可达到 70%, 较高时可达 79.1% (表 1)。

表 2 激素对芽分化的影响

项 目	激 素 配 比 (mg/L)					
	对照	BAP 1.5 NAA 0.2	BAP 2.5 NAA 0.2	BAP 1.5 IBA 0.1	BAP 2.5 IBA 0.1	BAP 1.5 IAA 1.5
接种材料数(个)	10	10	10	10	10	10
产生芽分化的材料数(个)	0	7	3	5	1	2
分化率(%)	0	70	30	50	10	20

### 2.3 培养基对芽分化的影响

以顶芽为试材, 在 BTM、GD、MS 以及改良 MS (氮元素减半) 为基本培养基, 补充 1.5 mg/L BAP 和 0.2 mg/L NAA, 进行了接种试验, 弄清了不同培养基对芽分化的影响。结果从表 3 可以看出, 氮元素含量偏高的 MS 以及偏低的 BTM、GD 培养基效果差, 而以氮元素含量适中的改良 MS 培养基效果比较好, 诱导率可达 97.7%。

表 3 培养基对芽分化的影响

项 目	培 养 基			
	BTM	GD	MS	改良 MS
接种材料数(个)	18	19	21	45
产生芽分化材料数(个)	5	2	14	44
分化率(%)	27.7	10.5	66.7	97.7

### 2.4 谷氨酸盐(Glutamine)对继代增殖系数的影响

在多次继代中, 芽分化出现了衰退现象。为避免衰退, 提高芽分化率, 在含有 1.5 mg/L BAP 和 0.2 mg/L NAA 的改良 MS 培养基的基础上, 再添加不同用量的谷氨酸盐, 以顶芽为材料, 进行接种。其结果从表 4 可以看出, 在第一次继代培养中, 含谷氨酸盐和不含谷氨酸盐的培养基对芽分化影响基本上无区别。但在第二、三次继代培养中相差很大, 在含 10 mg/L 谷氨酸盐的培养基上, 到第三次继代时, 增殖系数( $\beta_1$ )可提高到 127.5, 而在不含谷氨酸盐的培养基上, 到第三代继代增殖系数( $\beta_1$ )仅为 12.7。

表 4 谷氨酸盐对芽分化的作用

各次继代的繁殖率	谷氨酸盐(mg/L)			
	对照	5	10	15
$a_1$	4	4	6	4
$a_2$	2	2.2	5	4
$a_3$	1.86	2	5	3
增殖系数 $\beta_1$	12.7	15.3	127.5	40.8

注: 本试验初步定污染率  $f_1 = 16\%$ ; 壮苗率  $h_1 = 94.4\%$ , 即  $K_1 = 0.85$ 。

### 2.5 培养基对生根的影响

为探讨培养基、活性炭等对猕猴桃生根的综合影响, 作者设计了以下 6 种培养基, 进行了生根培养:

培养基 A: MS+ 0.1 mg/L NAA

培养基 B: MS(氮素减半)+ 0.1 mg/L NAA

培养基 C: MS(铁盐和氮素减半)+ 0.1 mg/L NAA

培养基 D: MS+ 0.1 mg/L NAA+ 活性炭 3%

培养基 E: MS(氮素减半) + 0.1 mg/L NAA + 活性炭 3%

培养基 F: MS(铁盐和氮素减半) + 0.1 mg/L NAA + 活性炭 3%

以上培养基均加琼脂 0.8%, 蔗糖 3%, pH 调到 5.8。

表 5 的结果表明, 在氮素减半或铁盐和氮素减半的 MS 培养基(培养基 B、C 组)上, 生根率可提高到 100%, 比对照(培养基 A 组)提高了 30% 左右。平均根长分别比对照长 4.2 cm 和 7.1 cm; 开始生根时间分别比对照早 3 d 和 6 d。添加活性炭与否, 对生根率没有大的影响, 但可以大大缩短生根时间及促进根的生长。添加 3% 活性炭的培养基 D、E、F 组比未加活性炭的培养基 A、B、C 组平均根长长 2.5~6.1 cm, 开始生根时间缩短了 2~6 d。根在黑暗的环境里生长良好, 活性炭刚好提供了这种环境, 所以有利于促进根的生长<sup>[8]</sup>。同时, 它还具有吸附作用, 可以吸附植物生根时相互产生的抑制物质, 以利于缩短生根时间。

表 5 不同培养基上生根状况

培养基	接种材料数 (个)	生根材料数 (个)	平均根长(cm)	生根率 (%)	开始生根时间 (d)
A	15	10	18.1	66.7	22
B	12	12	22.3	100	19
C	15	15	25.2	100	16
D	13	11	20.6	84.6	17
E	17	17	28.4	100	17
F	14	14	31.2	100	10

## 2.6 试管苗的移栽

当试管苗生出完整的根系之后, 在培养室内揭开盖子, 放置 3 d 后, 移到温度在 10~16 的温室里。3 d 后, 取出试管苗, 用毛笔轻轻洗掉粘附在根上的琼脂, 测量其主根和侧根长度之后, 移栽到珍珠岩(使用前一周期用 0.1% 波尔多液消毒)的扦插池里, 此后 14 d 的管理非常重要, 这是试管苗能否成活的关键。这个阶段需要较高的湿度和良好的通风条件。为此, 扦插池需盖上塑料薄膜以保持空气湿度。根据干燥情况, 每天喷雾 2~3 次。两周后移植到大田。移到大田后, 要特别注意防止病害发生, 每隔一周要用 0.1% 波尔多液消毒一次, 直到小苗健壮成活。本试验移苗 79 棵, 成苗 75 棵, 成活率为 94%。

## 2.7 繁殖能力的分析

在继代培养中, 第一次的最高增殖率  $a_1 = 6$ , 第二、三次的最高增殖率分别为  $a_2 = 5$ ,  $a_3 = 5$ , 所以, 在继代培养中最高的继代增殖系数  $\beta_1 = K_1 \times b = 0.85 \times 6 \times 5 \times 5 = 127.5$  (详见表 4)。

在生根培养中, 最高生根率  $e = 100\%$ , 根据实际操作经验, 确定生根培养的污染率  $f_2 = 15\%$ , 生根壮苗率  $h_2 = 100\%$ , 所以生根增殖系数  $\beta_2 = K_2 \times e = h_2 \times (1 - f_2) \times e = 100\% \times (1 - 15\%) \times 100\% = 0.85$ 。

在健化中, 成活率  $F = 94\%$ , 所以, 繁殖系数  $\epsilon = \beta_1 \times \beta_2 \times F = 127.5 \times 0.85 \times 94\% = 101$ 。即一个外植体在三次继代培养后最高可繁殖出 101 个外植体。有了这个系数作参考, 根据每年需要的苗木数量, 即可计算出开始所需外植体数量。

## 3 讨论

通过本研究认为, 在继代培养中, 添加一定量的谷氨酸盐, 可明显促进不定芽的分化, 提高

增殖率。特别是通过对繁殖系数 $\epsilon$ 的计算, 可以掌握繁殖能力的大小, 检验配方、试验操作的合理程度。但在组织培养的实际应用中, 成本和利润的核算, 是衡量成功与否的关键之一, 所以, 繁殖系数 $\epsilon$ 达到多少可以盈利, 还需进一步进行研究。另外, 在本试验中还发现, 猕猴桃的愈伤组织比较容易诱导, 如能通过愈伤组织不定胚苗或愈伤组织苗的培养, 将会进一步提高繁殖系数 $\epsilon$ , 降低成本。

### 参 考 文 献

- 1 梁晴芬. 中国猕猴桃属分类志要. 广西植物, 1930, (1): 30 ~ 35.
- 2 丁士林, 朱秀珍, 余厚敏. 等. 美味猕猴桃的组织培养. 中国果树, 1997, (2): 27 ~ 29.
- 3 朱道街. 软枣猕猴桃叶片愈伤组织分化再生植株. 植物生理学通讯, 1997, 33(2): 127 ~ 128.
- 4 刘翠云. 啞特猕猴桃微繁工艺流程的研究. 西北植物学报, 1997, 17(1): 118 ~ 123.
- 5 Chalupa V. *In vitro* propagation of oak and linden. biologia Plant, 1984, 26: 374 ~ 377.
- 6 Sommer H E, Brown C L, Kormanik P P, et al. Differentiation of plantlets in longleaf pine (*Pinus palustris* Mill) tissue cultured *in vitro*. Bot. Gaz., 1975, 136: 196 ~ 200.
- 7 Murashige T. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant, 1962, 15: 473 ~ 497.
- 8 (日) 佐藤亨. 阔叶树种的繁殖. 日本林木育种, 1997, (183): 25 ~ 29.

## Research on Tissue Culture and Reproductive Capacity of *Actinidia chinensis*

Wang Jianya      Kounou Kouzou

**Abstract** On the test of tissue culture, using shoot tips of *Actinidia chinensis* as explant, the highest rate of shoot differentiation is 79.1%, and the shoot differentiation rate of lateral shoot and stem are respectively 45.8% and 24.4%, and the shoot differentiation rate of blade is 0%. On the test of shoot differentiation and subculture, using shoot tips as explant, and the improved MS culture medium by increasing 1.5 mg/L BAP and 0.2 mg/L NAA, and half decreasing N element, the rate of shoot differentiation can reach 97.7%. It can obviously improve the coefficient  $\beta_1$  of subculture to add 10 mg/L glutamine on the test of subculture, when it comes to the third time of subculture,  $\beta_1$  can get to 127.5, however the check  $\beta_1$  is only 12.7. Taking MS culture medium on half decreasing N element or N element and Fe salt as taking root culture medium, the rooting rate can get to 100%, which increases 30% more than the comparison. The average root length are respectively 4.2 cm and 7.1 cm longer and the rooting time are respectively 3 days and 6 days earlier than those of the comparison. Adding 3% active carbon to rooting culture medium can further increase the root length and shorten the rooting time. The research holds that reproductive coefficient  $\epsilon$  is the main index to measure how many planting stock one explant can reproduce. It is  $\epsilon = 101$  on this test, which means that one explant can reproduce 101 planting stock.

**Key words** *Actinidia chinensis* tissue culture culture medium reproductive coefficient