

毛花猕猴桃愈伤组织诱导与植株再生 Callus Induction and Plant Regeneration from *Actinidia eriantha* Benth

张远记 钱迎倩
Zhang Yuanji Qian Yingqian

(中国科学院植物研究所 北京 100044)
(Institute of Botany, Academia Sinica, Beijing, 100044)

摘要 从毛花猕猴桃 (*Actinidia eriantha* Benth) 田间生长的茎段、种子无菌条件下萌发的下胚轴及试管苗的茎段和叶片得到愈伤组织。田间来源的茎段诱导愈伤组织较难,愈伤组织生长缓慢;下胚轴及试管苗茎段和叶片容易产生愈伤组织,愈伤组织生长旺盛。消毒时间、接种方法、基因型和培养基都可能影响到田间来源的茎段愈伤组织产生。在MS附加玉米素或6-苄氨基嘌呤(BAP)的培养基上下胚轴来源的愈伤组织不经转代即分化芽和根。试管苗茎段和叶片在附加玉米素或N-(2-氯基-4-吡啶基)-N'-苯基脲(CPPU)的MS培养基上培养一代也分化出芽。试管苗茎段在附加0.0025 mg/L CPPU和0.1 mg/L 吲哚乙酸(IAA)的MS培养基上产生愈伤组织、芽的分化和苗生长都较理想;试管苗叶片则以附加0.025 mg/L CPPU和0.1 mg/L IAA或0.5 mg/L 玉米素和0.1 mg/L IAA的MS培养基较好。当苗伸长至1 cm或以上时切下,转入MS基本培养基(大量元素减半)上后可形成完整植株。

关键词 毛花猕猴桃 愈伤组织 植株再生

Abstract Calli were induced from stem segments of field-grown plants, elongated hypocotyls, stem segments and leaves of in vitro seedlings of *A. eriantha*. Callus induction from hypocotyls and explants of in vitro seedlings was much easier and calli grew vigorously, and that from field-grown stem segments was difficult and calli grew slowly. Factors affecting callus induction from field-grown stem segments were found to be disinfection duration, genotypes, and growth regulators used. Adventitious buds and roots differentiated from hypocotyl-derived calli on MS medium supplemented with zeatin or benzyl-aminopurine (BAP) without subculture. Bud and occasionally root differentiation also occurred from in vitro seedlings on MS medium supplemented with zeatin or N-(2-chloro-4-pyridyl)-N'-phenylurea (CPPU) with one passage culture. The optimal media for the callus induction, bud differentiation and shoot growth to the stem segments of in vitro seedlings were MS medium supplemented with 0.0025 mg/L CPPU and 0.1 mg/L indole-3-acetic acid (IAA) and those to the leaves of in vitro seedlings were MS medium supplemented with 0.025 mg/L CPPU and 0.1 mg/L IAA or 0.5 mg/L zeatin and 0.1 mg/L IAA. Whole plants regenerated from shoots which were 1 cm in length or longer after transferring onto MS medium with half strength of macro-elements.

Key words *Actinidia eriantha*, callus induction, whole plant regeneration

毛花猕猴桃原产我国,果实维生素C含量高,达1.014 mg/100 g鲜重,而美味猕猴桃著名品种海沃德的维生素C含量仅200~370 mg/100 g鲜重^[1]。且毛花猕猴桃的果实较大^[2],有较大的开发利用价值。

现代生物技术在开发和利用种质资源方面具有

重要作用,如体细胞无性系变异,体细胞杂交,遗传转化及超低温种质保存等,可是这些技术都要求建立组织培养系统。毛花猕猴桃组织培养研究尚未见到报道。我们对毛花猕猴桃原生质体进行培养,已经得到再生植株^[3]。为了毛花猕猴桃原生质体培养能够顺利地有材料来源并能再生植株,我们对毛花猕猴桃的组织培养进行了比较系统的研究。本文报道毛花猕猴桃不同外植体诱导愈伤组织及植株再生的结果。

1994-10-31 收稿。

张远记为中国科学院植物研究所博士生;钱迎倩研究员为博士生导师。广西科学院院长(编者注)。

1 材料与方法

试验材料由中国科学院植物研究所北京植物园安和祥先生提供。田间生长的一年生茎段采回后先用自来水冲洗干净，然后用75%酒精浸泡30s，再用0.1% HgCl₂ 消毒不同时间，之后用无菌水冲洗4~6次。试管实生苗建立方法如下：自由授粉的毛花猕猴桃果实成熟后采回，取出种子。种子用75%酒精浸泡1min，然后用0.1% HgCl₂ 消毒10min，之后用无菌水冲洗4次。于无菌条件下解剖出胚，培养在MS⁽¹⁾基本培养基（大量元素减半）上，置于25℃、黑暗条件下直至萌发。然后置于25℃、12h光照（光照度1250lx）和22℃、12h黑暗条件下培养。伸长的下胚轴和无菌苗茎段（不带腋芽）均切成1cm小段、幼叶切成1cm×1cm小块，接种到不同培养基上诱导愈伤组织和芽分化。本试验所用基本培养基为MS附加蔗糖3%和琼脂0.6%，pH5.6。每处理接种3瓶，每瓶接4~6块（段），重复2次。培养条件为光照9h（光照度1250lx）、26℃/黑暗15h、24℃。

2 结果

2.1 田间来源的茎段诱导愈伤组织

HgCl₂ 消毒时间分别为5、7和9min，其中以7min最合适，5min污染严重，9min则造成材料死亡。对于茎段，消毒后将表皮用解剖刀轻轻刮去，小心切取韧皮薄片（厚约1mm，大小约0.5cm×1.0cm），垂直插入培养基中。用这种方法较易得到愈伤组织。

材料的基因型对诱导结果也有很大影响。本试验采用白花类型和紫花类型两种基因型的茎段诱导愈伤组织，结果见表1。白花类型的诱导率较高且生长速度相对较快。但总的来说，田间来源茎段诱导得到

表1 两种基因型的毛花猕猴桃茎段诱导愈伤组织情况

Table 1 Effects of genotypes of *A. eriantha* on the callus induction of stem segments

生长调节剂 Growth regulator (mg/L)	基因型 Genotype	诱导率 Frequency of Induction (%)	生长速度 Growth rate	质地 Character
2, 4-D 1.2+BAP 0.04	白花 White flower	75.7	++++	松软 Soft
2, 4-D 1.2+BAP 0.04	紫花 Purple flower	18.1	+	松软 Soft
2, 4-D 0.5+BAP 1.0	白花 White flower	48.6	++	较硬 Solid
2, 4-D 0.5+BAP 1.0	紫花 Purple flower	53.0	+	松软 Soft

基本培养基为MS。2, 4-D: 2, 4-二氯苯氧乙酸; BAP: 6-苄氨基嘌呤。MS was used as basic medium. 2, 4-D: 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid; BAP: 6-benzyl-aminopurine

的愈伤组织生长速度慢。

在以MS为基本培养基，分别或配合加入不同浓度的2, 4-D (0.2, 0.5, 1.0, 1.2, 2.0, 4.0和6.0 mg/L), NAA (萘乙酸, naphthaleneacetic acid) (0.05, 0.2, 0.5, 1.0和2.0 mg/L), BAP (6-苄氨基嘌呤) (0.04, 0.1, 0.2, 0.5, 1.0和3.0 mg/L)和玉米素 (1.0和3.0 mg/L)共20种处理中，以附加2, 4-D 1.2 mg/L+BAP 0.04 mg/L和2, 4-D 0.5 mg/L+BAP 1.0 mg/L两个组合对愈伤组织诱导的效果较好。但愈伤组织在前者上的质地松软，在后者上较硬（表1）。

2.2 以试管苗为材料的愈伤组织诱导与分化

2.2.1 下胚轴

黑暗下在MS基本培养基（大量元素减半）上萌发的胚，在下胚轴伸长到1cm时切下以诱导愈伤组织。发现在附加2, 4-D (0.5, 1.0 mg/L)配合BAP (0, 0.1, 0.5和1.0 mg/L)的MS培养基上，可得到生长速度快、色泽绿白的愈伤组织。2, 4-D浓度在2.0 mg/L或以上时，愈伤组织生长不良。上述激素各种不同浓度配合处理的愈伤组织诱导率均为100%。本试验曾将在附加2, 4-D 1 mg/L的MS培养基上诱导的愈伤组织，经一次继代后即可用于分离原生质体。分离的原生质体并能够分裂。在配有其他激素的MS培养基上 (BAP 0.1 mg/L+IAA 0.5 mg/L, 玉米素 1.0 mg/L) (IAA: 吲哚乙酸, indole-3-acetic acid)诱导到的愈伤组织体积小，但不经转代即可分化芽和根，进而长成完整植株。

2.2.2 试管苗茎段和幼叶

试管苗的茎段或幼叶接种于具不同激素配比的MS培养基上（表2），10天后都明显愈伤组织化，3周后开始分化芽。不同激素配比的培养基对茎段和幼叶诱导愈伤组织及其芽分化的影响见表2和图1。

表2 不同生长调节剂对毛花猕猴桃试管实生苗茎段和幼叶诱导愈伤组织及其芽分化的影响 (培养 60 天)

Table 2 Effects of growth regulators on the callus induction and bud differentiation of in vitro seedling stem segments and leaves of *Actinidia eriantha* (60 days after inoculating)

生长调节剂 Growth regulator (mg/L)	外植体 Explant	愈伤组织 诱导率 Frequency of callus induction (%)	愈伤组织分化情况 Callus differentiation		
			芽分化频率 Frequency of bud differentiation (%)	苗数 (≥1 cm) / 愈伤组织 Shoots (≥1 cm) /callus	苗生长情况 Shoot growth
CPPU 0.25+IAA 0.1	S	100	83.3	0	慢, 芽少 st, f
CPPU 0.25+IAA 0.1	L	100	100	0	慢, 芽较多 st, m
CPPU 0.025+IAA 0.1	S	100	100	0.58	稍快, 芽多 sl, n
CPPU 0.025+IAA 0.1	L	91.7	81.8	0.86	稍快, 芽多 sl, n
CPPU 0.025	S	100	83.3	0.3	较快, 芽少 fa, f
CPPU 0.025	L	100	87.5	0.7	较快, 芽少 fa, f
CPPU 0.0025+IAA 0.1	S	100	100	2.0	快, 芽较多 ft, m
CPPU 0.0025+IAA 0.1	L	75	100	0.2	慢, 芽少 st, f
玉米素 0.5+IAA 0.1	S	100	83.3	0.6	较快, 芽较多 fa, m
玉米素 0.5+IAA 0.1	L	91.7	100	0.8	较快, 芽较多 fa, m
玉米素 1.0	S	100	91.7	0.8	较快, 芽较多 fa, m
玉米素 1.0	L	75	100	0.2	慢, 芽较多 st, m

MS 为基本培养基。CPPU; N-(2-氯基-4-吡啶基)-N'-苯基脲; IAA; 吲哚乙酸; S; 茎段; L; 叶块。MS was used as basic medium. CPPU; N-(2-chloro-4-pyridyl)-N'-phenylurea; IAA; indole-3-acetic acid; S; stem segments; L; leaf pieces; st; slowest; sl; slow; fa; fast; ft; fastest; f; few buds; m; many buds; n; numerous buds.

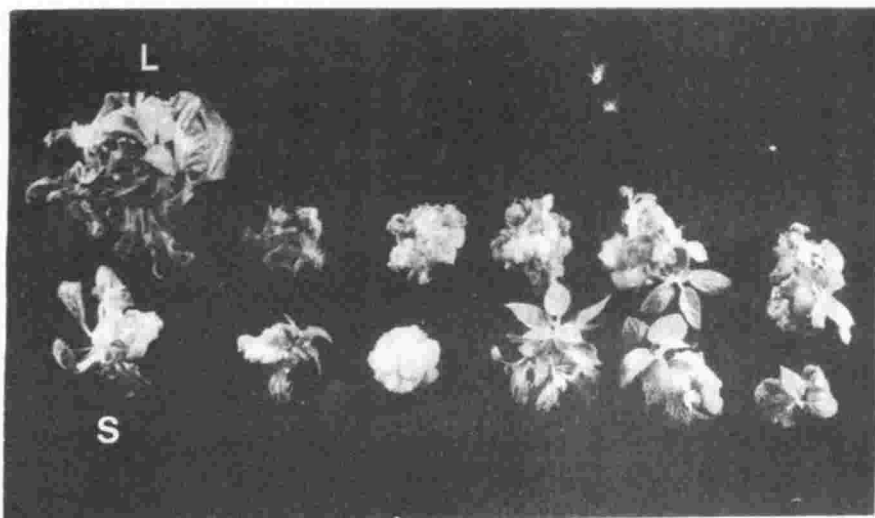


图1 试管苗茎段和叶块愈伤组织的芽分化情况

Fig. 1 Bud differentiation from calli derived from stem segments and leaves of in vitro seedlings

上排为叶块愈伤组织 (L), 下排为茎段愈伤组织 (S)。从左向右为在 MS 附加如下生长调节剂的培养基上 (mg/L): CPPU 0.025+IAA 0.1; CPPU 0.025; CPPU 0.25+IAA 0.1; CPPU 0.0025+IAA 0.1; 玉米素 0.5+IAA 0.1; 玉米素 1.0。Upper row; calli from leaves (L); lower row; calli from stem segments (S). Bud differentiation of the callus on MS medium supplemented with growth regulator (mg/L) (from left to right): CPPU 0.025+IAA 0.1; CPPU 0.025; CPPU 0.25+IAA 0.1; CPPU 0.0025+IAA 0.1; zeatin 0.5+IAA 0.1; zeatin 1.0



图2 生根的完整植株

Fig. 2 Rooted plant

前面已经提到, 我们做毛花猕猴桃组织培养的目的之一是为了研究毛花猕猴桃的原生质体培养。后来在毛花猕猴桃原生质体培养成功后, 又反过来, 用在原生质体培养中成熟的经验和方法再来丰富毛花猕猴桃组织培

养方法。我们曾将毛花猕猴桃原生质体得来的愈伤组织在附加玉米素 0.5 mg/L 和 IAA 0.1 mg/L 配合的 MS 培养基上分化出苗。本试验中, 该培养基对毛花猕猴桃试管苗茎段和叶块的愈伤组织诱导、芽分化和苗形成均有良好的效果, 苗生长正常。附加玉米素 1.0 mg/L 的 MS 培养基对茎段外植体的培养也较好, 苗形成较多且生长正常, 但该培养基对叶块的愈伤组织诱导率低, 苗生长慢且长出的叶片扭曲。

与玉米素相比, CPPU 在很低浓度就具有较强的效应。为确定 CPPU 的浓度范围, 本试验比较了不同浓度的 CPPU (2.5, 0.025 和 0.00025 mg/L, 均配合 IAA 0.1 mg/L) 对茎段和叶块的培养效果。茎段和叶块在 CPPU 0.00025 mg/L 的培养基上均未产生愈伤组织。在 CPPU 2.5 mg/L 培养基上愈伤组织生长慢, 芽分化少且生长极慢。CPPU 0.025 mg/L 的效果较好, 愈伤组织生长快, 芽分化多。虽然芽生长也慢并有叶扭曲, 但在转入 MS 基本培养基 (大量元素减半) 后形成生长正常的苗。因此进一步比较了 CPPU 0.25 和 0.0025 mg/L 两种浓度, 发现茎段在 CPPU 0.0025 mg/L (配合 IAA 0.1 mg/L) 上的愈伤组织诱导率和芽分化率均达到 100%, 形成的苗多 (平均每块愈伤组织有 2.0 个 ≥ 1 cm 的苗) 且生长健壮。CPPU 浓度过高时 (0.025 和 0.25 mg/L), 苗生长受到抑制且叶片扭曲。对于叶片外植体, 较高浓度 CPPU 有利于芽分化, 在具 CPPU 0.025 mg/L 的 MS 培养基上芽分化多并有较多的苗形成。在含 CPPU 的几种培养基上, 叶片外植体的芽分化率比相应的茎段外植体的多, 但苗数目少且生长慢。我们还注意到叶片外植体容易分化根。如在附加有 CPPU 0.025 mg/L, CPPU 0.025 mg/L 加 IAA 0.1 mg/L, CPPU 0.0025 mg/L 加 IAA 0.1 mg/L 及玉米素 0.5 mg/L 加 IAA 0.1 mg/L 的 MS 培养基上部分愈伤组织不但分化芽而且有根形成, 但茎段外植体仅在附加有 CPPU 0.0025 mg/L 加 IAA 0.1 mg/L 的 MS 培养基上形成根。另外, CPPU 配合 IAA (0.1 mg/L) 有利于芽的分化 (表 2, 图 1)。

将上述培养基上形成的苗转入 MS 基本培养基 (大量元素减半) 中, 长成健壮的小植株 (图 2)。

在另一次试验中, 以 MS 附加 2, 4-D 0.5 mg/L 加 BAP 1.0 mg/L, 2, 4-D 1.0 mg/L 及 2, 4-D 1.0 mg/L 加 BAP 1.0 mg/L 三种培养基诱导愈伤组织, 结果诱导率均为 100%。在含 2, 4-D 1.0 mg/L 的两种不同培养基上, 愈伤组织在接触培养基处变褐。在附加 2, 4-D 0.5 mg/L 加 BAP 1.0 mg/L 培养基上, 愈伤组织为白色, 生长速度快, 质地较疏松,

经长期继代, 愈伤组织生长状况稳定。

3 讨论

中华猕猴桃、美味猕猴桃茎段愈伤组织的诱导和分化已有大量报道^[1,5~14]。软枣猕猴桃也有报道^[14,15]。我们也曾对上述三种猕猴桃茎段诱导愈伤组织进行过研究, 很容易地得到了愈伤组织 (未发表)。毛花猕猴桃田间生长的茎段不易产生愈伤组织, 本试验虽在改进方法后诱导出愈伤组织, 但诱导率不高且生长较慢。然而毛花猕猴桃试管苗茎段、叶片及下胚轴在合适的培养基上愈伤组织诱导率可达到 100%, 分化生根也很容易, 说明是一种较理想的供试材料。

CPPU 具有强烈的细胞分裂素活性^[16]。用 CPPU 处理生长中的猕猴桃果实, 可增加果实体积、提早成熟时间^[17~19]。CPPU 用于猕猴桃组织培养目前仅见一例报道。Suezawa 等^[20]在进行美味猕猴桃细胞悬浮培养物诱导分化时, 发现 CPPU 对不定芽形成非常有效, 但未说明使用浓度。本试验表明, 对于毛花猕猴桃试管实生苗的茎段和叶片诱导愈伤组织和分化时, 很低浓度 (0.025~0.0025 mg/L) 的 CPPU 具有良好的效果, 并且不影响不定根形成。

参考文献

- 1 Qian Y Q, Yu D P. Advances in *Actinidia* research in China. Acta Hort, 1991, 297: 51~55.
- 2 梁畴芬. 中国猕猴桃属分类志要. 广西植物, 1980, (1): 30~45.
- 3 张远记, 母锡金, 蔡起贵等. 毛花猕猴桃叶片原生质体再生植株. 植物学报, 1995, 37: (印刷中)
- 4 Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant, 1962, 15: 473~497.
- 5 桂耀林. 猕猴桃离体茎段愈伤组织的诱导和植株再生. 植物学报, 1979, 21: 339~343.
- 6 Pedroso M C, Oliveira M M, Pais M S. Micropropagation and simultaneous rooting of *Actinidia deliciosa* var. *deliciosa* "Hayward". Hort Sci, 1992, 27: 443~445.
- 7 林贵美, 叶翠娟. 硬毛猕猴桃组培育苗试验简报. 广西农业科学, 1988, (6): 23~25.
- 8 Barbieri C, Morini S. Shoot regeneration from callus cultures of *Actinidia chinensis* (cv. Hayward). Acta Hort, 1988, 227: 470~472.
- 9 Revilla M A, Power J B. Morphogenetic potential of long-term callus cultures of *Actinidia deliciosa*. J Hort Sci, 1988, 63: 541~545.
- 10 Monette P L. Organogenesis and plantlet regeneration following. Guangxi Sciences, Vol. 1 No. 4, November 1994

- lowing in vitro cold storage of kiwifruit shoot tip cultures. *Sci Hort*, 1987, 31: 101~106.
- 11 杨增海. 猕猴桃离体培养. *植物生理学通讯*, 1985, (3): 25.
 - 12 林国辉, 郭清平. 中华猕猴桃试管苗培育和栽培技术. *农业科技通讯*, 1985, (5): 16.
 - 13 黄贞光, 谭素英. 猕猴桃的组织培养. 见: 陈正华主编. 木本植物组织培养及其应用. 北京: 高等教育出版社, 1986, 433~443.
 - 14 洪树荣. 猕猴桃离体茎段和叶愈伤组织的诱导和植株再生. *湖北农业科学*, 1981, (9): 28~30.
 - 15 王际轩, 李淑珍, 李博文等. 猕猴桃的组织培养繁殖. *辽宁农业科学*, 1982, (1): 32~34.
 - 16 Huetteman C A, Preece J E. Thidiazuron: A potent cytokinin for woody plant tissue culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Cult*, 1993, 33: 105~119.
 - 17 Lawes G S, Woolley D J, Cruz-Castillo J G. Field responses of kiwifruit to CPPU (cytokinin) application. *Acta Hort*, 1991, 297: 351~356.
 - 18 Lotter J de V. A study of the preharvest ripening of Hayward kiwifruit and how it is altered by N-(2-chloro-4-pyridyl)-N-phenylurea (CPPU). *Acta Hort*, 1991, 297: 357~366.
 - 19 Biasi R, Costa G, Giuliani R et al. Effects of CPPU on kiwifruit performance. *Acta Hort*, 1991, 297: 367~374.
 - 20 Suezawa K, Matsuta N, Omura M et al. Plantlet formation from cell suspensions of kiwifruit (*Actinidia chinensis* Planch. var. *chinensis*). *Sci Hort*, 1988, 37: 133~128.

(责任编辑: 蒋汉明)

《广西科学》征订启事

广西区科委、区教委、区科协和广西科学院联合主办的《广西科学》是以反映自然科学学术研究成果和高新技术应用基础理论研究成果为主的综合性期刊。主要刊登内容有: 广西自然科学各领域中具有较高学术价值的学术论文和重要科研实验报告, 代表广西科学先进水平的具有创造性的科研成果、新理论、新发现和高新技术的应用基础理论, 技改和“星火”项目的新成就, 科技政策、学术动态、信息简报等; 同时也刊登国内外专家学者研究广西或在广西工作的科学技术研究成果。

《广西科学》治学力求严谨, 编辑执行国家标准, 印刷装帧讲究; 主要读者对象是从事自然科学研究与开发的科技工作者、大专院校师生、教科文卫专业技术干部及科技管理干部。

《广西科学》为季刊, 标准 16 开本, 80 页; 国内定价(含邮资): 每期 6 元, 全年优惠价 20 元; 国外定价: 每期 6 美元, 全年优惠价 20 美元。《广西科学》1994 年 2 月创刊, 欢迎广大读者订阅; 同时也欢迎广大作者投稿(参看《广西科学》稿约)。

凡订阅《广西科学》者, 请与《广西科学》编辑部联系, 书款汇到, 即寄发票。

汇款地址: 广西南宁市江南路西一里广西科学院综合楼

收款人: 蒋汉明

邮政编码: 530031 电话: (0771) 4830135

(转帐 开户名称: 广西科技期刊编辑学会

开户行: 广西南宁江南建行

帐号: 2072386)

《广西科学》编辑部

1994 年 11 月 15 日