

紫果猕猴桃幼胚愈伤组织诱导及植株再生

付志惠, 李洪林, 李琼, 杨波*

(中国科学院武汉植物园, 武汉 430074)

摘要: 以紫果猕猴桃(*Actinidia arguta* var. *purpurea*)幼胚为外植体,诱导愈伤组织并进行植株再生。结果表明:不同的培养基和不同的培养条件对幼胚愈伤组织的诱导率及分化率不同;0.2 mg/L ZT与0.5 mg/L GA₃配合使用有利于促进愈伤组织的诱导;7%蔗糖、600 mg/L CH与400 mg/L Gln都有利于促进愈伤组织的形成;在添加0.5 mg/L 6-BA、0.05 mg/L NAA与0.5 mg/L GA₃的MS培养基中植株的再生率达93.3%。

关键词: 紫果猕猴桃; 幼胚; 愈伤组织; 植株再生

中图分类号: Q943.1; S663.4

文献标识码: A

文章编号: 1000-470X(2004)05-0459-04

Callus Induction and Plantlet Regeneration from The Immature Embryo of *Actinidia arguta* var. *purpurea*

FU Zhi-Hui, LI Hong-Lin, LI Qiong, YANG Bo*

(Wuhan Botanical Garden, The Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430074, China)

Abstract: The immature embryo of *Actinidia arguta* var. *purpurea* were cultured on three different media to induce callus. The results show the callus was obtained from basic MS media with the combination of 0.2 mg/L ZT and 0.5 mg/L GA₃. High callus induction frequency was obtained from MS media supplemented with 7% surgar, 600 mg/L CH and 400 mg/L Gln. The highest rate of regeneration was found under the MS media supplemented with 0.5 mg/L 6-BA, 0.05 mg/L NAA and 0.5 mg/L GA₃.

Key words: *Actinidia arguta* var. *purpurea*; Immature embryo; Callus; Plantlet regeneration

猕猴桃果实因其独特的营养价值、药用价值和较高的经济价值受到世界的关注和人们的喜爱,紫果猕猴桃(*Actinidia arguta* var. *purpurea*)是软枣猕猴桃的一个变种,果皮光滑,成熟时果肉全部紫红色,极为美观^[1],利用其红色果肉的遗传资源,作为猕猴桃远缘杂交的亲本,培育出果大美观、果肉紫红艳丽、品质风味具佳的新品种是目前猕猴桃育种的一个热点;但在武汉地区紫果猕猴桃常发生早期落果,不易得到成熟的果实,利用胚培养的方法,实施早期胚抢救,对选育红肉、大果品种有着重要意义。

1 材料与方法

材料由中国科学院武汉植物园猕猴桃种质资源圃获得。取花后66 d未成熟果实,洗净表面,在超净工作台上用0.1%的升汞消毒12 min,再用无菌水冲洗4~5次,将其置于灭过菌的滤纸上吸干水分后从果实中部剥开,取出种子,在解剖镜下剥去种壳,用镊子按住种子中后部,挤出针状胚,迅速接种到配制好的培养基上,培养温度28℃,每日光照12 h,光强2 000 lx,每20 d继代一次。比较了基本培养基、附加有机成分、不同糖浓度、不同激素及其配比对幼

收稿日期:2003-12-19,修回日期:2004-05-08。

基金项目:中国科学院方向项目(KSCX2-SW-320)。

作者简介:付志惠(1977—),女,实习研究员,从事植物组织培养研究工作。

* 通讯作者。

胚的愈伤组织诱导、分化及植株再生的影响。其中：基本培养基为 Monnier、MS、White，分别附加 0.2 mg/L 6-BA、600 mg/L 水解酪蛋白(CH)、7% 蔗糖；MS 培养基分别附加谷氨酰胺(Gln)、水解酪蛋白(CH)、水解乳蛋白(LH)、番茄汁(TJ)、不同浓度激素等处理。

2 结果与分析

2.1 不同基本培养基对幼胚培养的影响

分别以 Monnier^[2]、White、MS 为基本培养基

(均附加有 0.2 mg/L 6-BA、600 mg/L CH、7% 蔗糖)，每种培养基中接 20 个幼胚，观察幼胚的褐化与出愈情况(表 1)。

结果表明：离体幼胚在不同培养基中的生长发育情况存在很大差异，以 MS 为基本培养基对幼胚的诱导最好。在 Monnier 培养基中培养 20 d，40% 幼胚褐化死亡，培养 50 d，90% 幼胚褐化死亡，10% 幼胚产生透明松散愈伤，不具分化能力；在 White 培养基中培养 20 d，45% 的幼胚褐化死亡，培养 50 d，幼胚全部褐化死亡，出愈率为 0；在 MS 培养基

表 1 不同基本培养基对幼胚培养的影响
Table 1 Effect of different basic media on immature embryo culture

基本培养基 Basic media	接种数 Num. of explant (piece)	20 d				50 d			
		褐化数 Num. of brown body (piece)	褐化率 Per. of brown body (%)	出愈数 Num. of callus (piece)	出愈率 Per. of callus (%)	褐化数 Num. of brown body (piece)	褐化率 Per. of brown body (%)	出愈数 Num. of callus (piece)	出愈率 Per. of callus (%)
Monnier	20	8	40	0	0	18	90	2	10
White	20	9	45	0	0	20	100	0	0
MS	20	5	25	3	15	5	25	5	25

中培养 20 d，25% 的幼胚褐化，15% 的幼胚产生白色愈伤，50 d 时，25% 的胚产生白色愈伤，其余幼胚基本不生长，将白色愈伤体转到适当培养基中培养，20 d 后愈伤膨大，逐渐转绿，少量形成根。

2.2 不同激素对幼胚愈伤组织诱导及胚萌发的影响

以 MS 为基本培养基，将幼胚分别接种到以 6-BA 为 0.2 mg/L 恒定不变，分别与 NAA、GA₃、2,4-D 及 ZT 配合使用或者以 ZT 为 0.2 mg/L 恒定不变，分别与 NAA、GA₃、2,4-D 配合使用^[3]的培养基中培养 10 d 后，P₁₋₄、P₁₋₅ 至 P₁₋₆ 培养基上幼胚开始

萌动，继续培养，20 d 后观察幼胚的生长发育及愈伤组织诱导情况(表 2)。

实验结果表明：ZT 较 6-BA 对愈伤组织的诱导有利，GA₃ 对猕猴桃幼胚生长发育及愈伤组织的诱导也起着积极作用，尤其是与 ZT 配合效果更好，在添加 0.2 mg/L ZT 与 0.5 mg/L GA₃ 的培养基中，幼胚愈伤组织的诱导率最高(52.9%)且诱导出的愈伤组织全部是致密、具分化能力的有效愈伤(图 1:a)，而在添加 0.2 mg/L 6-BA 的任一培养基中幼胚愈伤诱导率均低于 35% 且有效愈伤率低，仅与 GA₃ 的

表 2 不同激素对幼胚愈伤组织诱导及胚萌发的影响
Table 2 Effect of different hormones on the callus induction and embryo sprouting of immature embryo

培养基 Media	不同激素 Different hormones (mg/L)					接种胚数(个) Num. of inoculation embryo	出愈胚 Embryo of inducing callus		有效愈伤* Effective callus		萌发胚 Sprouting embryo		
	6-BA	ZT	2,4-D	GA ₃	NAA		No.	%	No.	%	No.	%	
							No.	%	No.	%	No.	%	
P ₁₋₁	0.2			0.5		17	0	0	0	0	2	11.8	
P ₁₋₂	0.2			0.5		17	5	29.4	2	40	0	0	
P ₁₋₃	0.2		0.5			18	2	11.1	0	0	0	0	
P ₁₋₄	0.2	0.2				20	7	35	0	0	0	0	
P ₁₋₅		0.2		0.5		15	5	33.3	3	60	3	16.7	
P ₁₋₆		0.2	0.5			17	9	52.9	9	100	0	0	
P ₁₋₇	0.2	0.5				21	2	9.5	0	0	0	0	

* 有效愈伤表示愈伤组织致密，具分化出苗能力的愈伤。

* Effective callus refers to compact callus with the developmental ability of seedling.

组合中有2个有效愈伤产生;ZT与6-BA配合使用对幼胚生长发育不利,虽然0.2 mg/L 6-BA与0.2 mg/L ZT的组合对幼胚愈伤组织的诱导率为35%,但它诱导出的愈伤组织全部呈透明疏松状,这种愈伤不具分化茎芽的能力,继续培养一段时间后会逐渐褐化死亡,为无效愈伤;在添加2,4-D的组合中,幼胚愈伤组织诱导率均不高,且有效愈伤数均为0;添加NAA的培养基能促使幼胚实现早熟萌发,接种后第12 d幼胚尖部出现绿色芽点,之后有细小子叶伸出,但萌发苗畸形,子叶卷曲,根浓密粗壮,近培养基基部有大量白色疏松状愈伤组织产生。

2.3 有机物对幼胚发育及愈伤组织形成的影响

据前人报道,较高的蔗糖对于防止幼胚早熟萌发有积极作用^[4],我们所做的实验结果也表明:7%蔗糖对幼胚生长发育有利,这与蔗糖能提高培养基的渗透压有关;在3%蔗糖含量的培养基中幼胚多形成透明,松散的愈伤体,不能分化出芽,有些幼胚过早萌发形成无胚芽或胚根的肥大子叶苗;但蔗糖

含量达到9%时,培养20 d后发现幼胚基本上不生长,部分有褐化现象。添加单一的Gln有助于幼胚生长,将600 mg/L CH与400 mg/L Gln配合使用更有利于促进愈伤组织的形成,但添加50% TJ则会导致幼胚逐渐褐化死亡,500 mg/L LH对诱导愈伤没有明显效果。

2.4 不同激素对愈伤组织增殖的影响

将形成的14个有效愈伤分别转至P₁₋₂、P₁₋₅与P₁₋₆培养基中进行增殖,为了便于统计,这里规定直径0.5 cm为一个计量单位(表3)。结果表明,在添加0.2 mg/L ZT与0.5 mg/L GA₃的培养基中愈伤组织增殖迅速,培养20 d后增殖倍数达3.6,培养40 d后增殖倍数达10.4,并且由增殖所得到的愈伤均为致密具分化能力的绿色愈伤组织,而在6-BA与GA₃的作用下愈伤增殖倍数仅为2.6,并且继代2次后愈伤组织变得疏松,颜色也逐渐转为黄白色,分化能力降低。

表3 不同激素对愈伤组织增殖的影响
Table 3 Effect of different hormone on proliferation of callus

培养基 Medium	不同激素 Different hormones(mg/L)				接种愈 伤数* Num. of inoculation callus	20 d		40 d	
	6-BA	ZT	GA ₃	NAA		增殖数* Num. of multiplication	增殖倍数 Fold of multiplication	增殖数* Num. of multiplication	增殖倍数 Fold of multiplication
P ₁₋₂	0.2		0.5		5	8	1.6	13	2.6
P ₁₋₅		0.2		0.5	4	7	1.75	12	3
P ₁₋₆	0.2	0.5			5	18	3.6	52	10.4

* 均指以直径约等于0.5 cm为一个计量单位的愈伤组织个数。

* Refers the number of calli in diameter of about 0.5 cm.

2.5 愈伤组织的分化与植株再生

将绿色愈伤组织块转至P₂₋₁、P₂₋₂、P₂₋₃与CK培养基中使其分化,培养60 d统计分化出苗的愈伤组织块数量(表4)。结果表明:激素对愈伤组织的分

化和植株再生是至关重要的,在不含任何激素的CK培养基中,愈伤组织不分化,不能得到再生植株,并且培养2代后,愈伤组织颜色逐渐变黄直至白色,且致密愈伤变得疏松;在添加0.5 mg/L

表4 植株的再生情况
Table 4 Regeneration of plantlets from callus

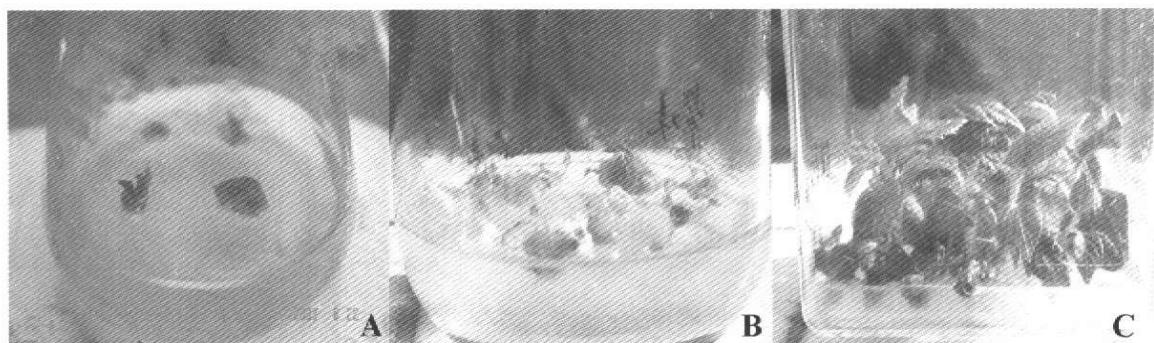
培养基 Medium	不同激素 Different regulators(mg/L)				接种愈 伤数* Num. of inoculation callus	出苗愈 伤数* Num. of callus inducing plantlets	再生率 Percentage of regeneration (%)
	6-BA	ZT	NAA	GA ₃			
P ₂₋₁	0.5		0.05		15	12	80
P ₂₋₂		0.5	0.05		15	2	13.3
P ₂₋₃	0.5		0.05	0.5	15	14	93.3
CK	0	0	0	0	15	0	0

* 均指以直径约等于0.5 cm为一个计量单位的愈伤组织个数。

* Refers the number of calli in diameter of about 0.5 cm.

ZT 与 0.05 mg/L NAA 的培养基上分化出苗的愈伤数量较少(13.3%),大部分愈伤只是不断长大而不分化;在仅添加 6-BA 与 NAA 的培养基中愈伤组织继续长大,植株的再生率为 80%,能得到健壮的

完整植株,但其只形成单个植株;在 0.5 mg/L 6-BA、0.05 mg/L NAA 与 0.5 mg/L GA₃ 配合作用下,再生率最强(93.3%),并且有丛生芽产生(图 1:B,C)。



A. 愈伤组织诱导; B. 愈伤组织分化出芽; C. 再生植株
A. Callus induction; B. Buds induced from callus; C. Regeneration plantlets

图 1 紫果猕猴桃的幼胚愈伤组织诱导及再生植株

Fig. 1 Callus induction and regeneration plantlets from immature embryo of *Actinidia arguta* var. *purpurea*

3 讨论

紫果猕猴桃种子很小,在剥胚的时候要特别注意种喙的方向,只有找准种喙方向,才能保证针状胚不受伤害的被挤出来,进行离体培养。

紫果猕猴桃幼胚培养经过两条途径(胚直接萌发成苗和愈伤组织分化成苗)均可发生。诱导两条成苗途径的发生,培养基因素至关重要,从实验结果看出,NAA 对胚的萌发有利,在添加 0.5 mg/L NAA 的 2 种培养基中均可促使胚早熟萌发,但萌发苗畸形,子叶卷曲,根浓密粗壮,不能正常生长发育,其致畸因素有待进一步研究;6-BA 与 2,4-D 对幼胚愈伤组织的诱导不利,多为无效愈伤;ZT 与 GA₃ 配合使用对幼胚继续生长直至诱导出愈伤组织的效果最好,再将其转到添加 6-BA、NAA 与 GA₃ 的分化培养基中可使其分化得到再生植株。

另外,有机物对猕猴桃幼胚生长发育及愈伤组织的诱导也起着重要作用,较高浓度的蔗糖含量能提高培养基的渗透压,促使幼胚继续生长,防止早熟萌发,600 mg/L CH 与 400 mg/L Gln 配合使用对诱导胚性愈伤也有促进作用。

近年来关于猕猴桃属胚抢救的研究报道较

少^[3,5],尤其在红肉品种方面少见报道。实现对紫果猕猴桃幼胚培养两条成苗途径的控制,有目的地诱导离体胚朝向其中任一途径发展,为克服猕猴桃远缘杂交不亲和性,营救胚胎,选育新的猕猴桃品种提供手段。

致谢: 实验过程中得到王圣梅老师、何子灿老师的帮助,在此表示最诚挚的感谢!

参考文献:

- [1] 崔致学.中国猕猴桃[M].山东:山东科学技术出版社,1993.77—79.
- [2] 李浚明.植物组织培养教程[M].北京:中国农业大学出版社,1996.209—210.
- [3] Mu S K, An H X, Cai D R. The culture regime suitable for the rescue of hybrid embryos in *Actinidia* [J]. *Acta Hortic*, 1995, **40**: 63—65.
- [4] 中国科学院上海植物生理研究所细胞室编译.植物组织和细胞培养[M].上海:上海科学技术出版社,1978.218—220.
- [5] Hirsch A M, Testolin R, Brown S, Chat J, Fortune D, Bureau J M, DeNay D. Embryo rescue from interspecific crosses in the genus *Actinidia* (kiwifruit) [J]. *Plant Cell Rep*, 2001, **20**: 508—516.