

猕猴桃组织培养研究进展

杨柯金, 于相丽, 郝微微 (1. 南阳师范学院生物系, 河南南阳473061; 2. 洛阳师范学院生命科学学院, 河南洛阳471022)

摘要 综述了国内外猕猴桃组织培养中外植体选择、培养条件等方面的内容, 并对猕猴桃组织培养的意义及存在的问题进行了讨论。

关键词 猕猴桃; 组织培养

中图分类号 Q943.1 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2006)13-3015-03

猕猴桃 (*Actinidia Lindl.*) 是多年生藤本植物, 是20世纪人工驯化栽培野生果树最早的四大树种之一^[1]。我国发现利用的最早, 无论是种群数量, 分布范围还是总蕴藏量, 均居世界首位, 故有“猕猴桃故乡”之称。猕猴桃营养丰富、医疗价值高, 被誉为营养、保健、长寿、美容的世界珍果, 水果之王, 已经成为当今世界的新兴栽培果树。20世纪70年代开始猕猴桃组织培养的研究, 获取了不少成功。近年来对猕猴桃的组织培养研究进展较大。

1 外植体

外植体的种类及其选择在猕猴桃组织培养中有重要影响。目前猕猴桃组织培养主要是器官培养和原生质体培养。离体培养使用最多的是带芽的外植体、胚、分化的器官组织(包括嫩茎、嫩叶、形成层、根、花萼等二倍体组织)、花粉及胚(单倍体组织)都可以作为猕猴桃组织培养的外植体, 但生殖器官、花、种子、果实少见报道。猕猴桃原生质体培养始于1983年, 至今已在中华猕猴桃、毛花猕猴桃、美味猕猴桃、葛枣猕猴桃、狗枣猕猴桃、软枣猕猴桃等基因型种质资源进行了原生质体分离、培养研究, 其中3个获得了再生植株。

1.1 猕猴桃的器官培养 丁士林^[2]等提出, 对美味猕猴桃的组织培养来说, 茎尖为快繁的最佳外植体材料。叶片虽然分化慢, 但在严格消毒条件下, 也可选用。茎段不宜做快速繁殖的材料。朱德瑶等^[3]提出中华猕猴桃茎段愈伤组织诱导成苗可以达到55.28%, 叶柄为1.67%, 而叶片没有分化。洪树荣^[4]指出软枣猕猴桃田间苗茎段愈伤发生率仅50%。贾景明^[5]等以东北地区软枣猕猴桃不同外植体进行诱导培养和继代培养, 结果发现, 以幼茎作为外植体愈伤组织诱导率最高, 可达75%, 并从诱导出的愈伤组织上继续进行分化培养, 获得了再生植株。郭延平^[6]等开展了猕猴桃果肉的愈伤组织诱导, 暗培养3d, 获得了愈伤组织, 诱导率为100%。汪建亚^[7]等以猕猴桃顶芽作为外植体进行离体培养, 芽分化率最高, 达到79.1%, 侧芽和茎段分别可达45.8%和24.4%, 叶片的芽分化率为0。

1982年, 黄贞光^[8]等报道了从中华猕猴桃的胚乳获得三倍体植株。桂耀林^[9]等报道中华猕猴桃、硬毛猕猴桃的胚乳培养在MS+ZT3 ng/kg+2,4-D 0.5 ng/kg+CH400 ng/kg的分化培养基上诱导产生愈伤组织, 在MS+ZT1 ng/kg+CH400 ng/kg的分化培养基上产生胚状体和长成完整的小植株。王碧琴^[10]在胚乳生根方面作了探讨。至今为止, 已对美

味猕猴桃^[9,11]、中华猕猴桃^[8,9]、狗枣猕猴桃^[11]、软枣猕猴桃^[11]等基因型的种质资源进行了胚乳培养, 并获得了再生植株。

1.2 猕猴桃的原生质体培养 1983年Cassio^[12]等从中华猕猴桃叶片和愈伤组织分离原生质体获得成功。1987年Pais^[13]等用猕猴桃叶柄段块产生易散愈伤组织用以分离原生质体。1988年Mi^[14]和Chashi^[15]报道了茎段原生质体再生植株成功。1988年我国蔡起贵首次报道了中华猕猴桃叶愈伤组织原生质体再生植株。肖尊安等报道了从中华猕猴桃与美味猕猴桃叶子愈伤组织分离出原生质体, 经分离诱导获得再生植株。胡家金^[16]等以美味猕猴桃雄株茎段愈伤组织为材料, 分离原生质体, 采用二步诱导分化方法将原生质体来源的愈伤组织诱导分化出苗, 再诱导生根, 形成完整的植株。

2 培养条件

2.1 基本培养基 猕猴桃组织培养常用基本培养基为MS和1/2MS, 其中1/2MS主要用于生根培养。另外, 也有使用N₆、M₁、B₅等其他培养基。刘翠云^[17]等认为, 使用MS培养基效果要好于用N₆。汪建亚等^[18]提出氮素营养在猕猴桃组织培养中对愈伤组织诱导和分化有较大的作用。琼脂使用的浓度约为0.7%, 猕猴桃组织培养中多用固体培养基而用液体培养基较少, 但Monette^[19]等指出液体培养的组织鲜重增长和产生的芽多于固体培养基。蔗糖一般为20%~40%, 蔗糖浓度对于猕猴桃组织培养也有重要作用, 适宜浓度的蔗糖可促进芽的增殖, 过高时产生大量的愈伤组织而不利于芽的增殖。Dinassi^[20]等指出高浓度的蔗糖可以增加叶肉细胞的叶绿体数目及淀粉含量, 而且在高浓度Mg²⁺(105 mg/L)存在的情况下, 高浓度的蔗糖可以增加叶肉细胞的大小。pH值一般5.8~6.0, Marino^[21]等提出, pH值7.0~7.5比pH值5.7更有利于猕猴桃愈伤组织的生长, 但对芽的分化不是很好。Faniari^[22]等则指出培养基的pH值对于猕猴桃愈伤组织的生长没有大的影响, 只是pH值为7.0时对芽的再生及芽的生长有利。

2.2 激素 培养基中激素的种类及比例是猕猴桃组织培养研究成功的关键之一。多数学者提出, 在猕猴桃组织培养中必须使用ZT才能诱导出再生植株。谢志兵^[23]等提出, 从分化的芽和大芽数来看, ZT对诱导愈伤组织芽分化最有效, 适宜浓度为2.0 ng/L。6-BA和NAA之间具有协同作用。ZT对愈伤组织的增殖有明显的促进作用, 且较低浓度的ZT有利于愈伤组织的增殖。GA₃亦有促进愈伤组织增殖的作用。IBA也有促进愈伤组织增殖的作用, 但效果没有ZT与GA₃明显。而NAA却抑制愈伤组织的增殖。张远记等^[24]在软枣

基金项目 南阳师范学院资助项目。

作者简介 杨柯金(1979-), 女, 河南南阳人, 硕士, 讲师, 从事细胞分子生物学的教研工作。

收稿日期 2006-03-03

猕猴桃试管苗叶片和茎段愈伤组织诱导与植株再生中也提出 ZT 的效果好于 BA、KT、TDZ、CPPU。樊军锋等^[25] 经过试验提出高浓度的 BA 可与 ZT 取得相同的效应,且效果好与 ZT。丁世林^[2] 在美味猕猴桃的组织培养中也尝试了用 6-BA 代替 ZT,降低了成本,效果也较理想。近来越来越多的试验也证明,即使不使用 ZT,BA 一样可以诱导芽的发生。丁士林指出,以 1/2MS + 0.7 ng/L IBA 生根较为理想,生根率高达 97.1%,根多、短粗且有绒毛,愈伤组织少。谢志兵^[23] 等指出 ZT 既有利于愈伤组织的增殖和分化,也有利于试管苗的生根,适宜浓度为 1 ng/L。6-BA 2.0 ng/L + GA₃ 0.5 ng/L + IBA 0.3 ng/L、ZT 1.0 ng/L、ZT 2.0 ng/L 3 处理的生根效果最好,培养过程中使用 ZT 和 IBA 有利于生根。PP₃₃₃ 在猕猴桃组织培养中常用作壮苗。

2.3 附加物质 猕猴桃组织培养中使用的附加物质很多,如维生素类,氨基酸及有机附加物:谷氨酸、谷氨酰胺、酪氨酸、精氨酸、水解酪蛋白、水解乳蛋白、抗氧化剂类;生根诱导中使用的活性碳以及一些天然物质,如椰汁等。

维生素类与植物体内各种酶的形成有关。使用浓度一般为 0.1 ~ 1.0 ng/L,其中以维生素、盐酸、硫酸素、盐酸吡哆素、烟酸、维生素 B₁₂、生物素及维生素 C 最常用。在各种维生素中,硫酸素可能是必需的,而烟酸及盐酸吡哆素对生长只有促进作用。肌醇本身不促进外植体生长,但可能有助于活性物质发挥作用,提高硫酸素的效果,从而促进外植体生长、胚状体及芽的形成。培养基中肌醇的用量为 50 ~ 100 ng/L。

氨基酸是培养基中重要的有机氮源。甘氨酸能促进离体根的生长,用量 2 ~ 3 ng/L。丝氨酸和谷氨酰胺有利于花药胚状体或不定芽的分化。

谢志兵^[26] 认为水解酪蛋白对诱导愈伤组织和芽的分化并没有明显的效果,对促进芽苗的生长有一定作用,以 60 ng/L 的效果最为显著。

天然有机物,椰汁、香蕉泥,会提供一些必要的微量营养成分、生理活性物质和生长激素等。但由于这些天然有机物成分复杂且不确定,很难保证重复一致,所以在研究中不提倡使用。

2.4 抗菌素 近年来,国外的一些学者开始研究青霉素对栽培植物生长发育的影响,尤其是青霉素与植物激素的关系及其作用方式,取得了一定的结果,基本肯定了青霉素也是一种植物生长调节剂。

郑秀珍^[27] 指出:青霉素、链霉素在猕猴桃组织培养中不管是分别使用还是混合使用,对芽的增殖都有一定促进作用,效果与抗生素本身的浓度有关。青霉素对猕猴桃试管苗的生根有明显的促进作用。其促进作用的大小与外源激素的种类有一定的关系。青霉素在 NAA 存在时,有促进生根的作用。IBA 和 GA₃ 对青霉素存在一定的制约作用。链霉素对根和生长有抑制作用。青霉素对提高叶绿素的含量有促进作用,青霉素、链霉素混合使用时对猕猴桃试管苗的形成和生长及叶绿素的含量都不利,两者合用有明显的制约作用。

2.5 其他影响因素 猕猴桃组织培养条件一般是:温度 18 ~ 28 ℃,光照强度 1 500 ~ 3 500 lx。陈正华^[28] 等在中华猕猴桃

桃组织培养时采用的培养条件为:25 ℃左右,光照 12 h/d,光强 850 ~ 1 200 lx。阳小成^[29] 等在中华猕猴桃的组织培养及其实用快速繁殖中,采用条件为 25 ~ 28 ℃,光照 12 ~ 14 h/d,光照度 2 500 lx 左右。谢志兵^[23] 所采用条件为 温度 25 ~ 28 ℃,每天光照 12 h,光照度为 800 ~ 1 200 lx。各自所采用条件略有差异。Dimassi^[20] 等提出较高的光照强度对试管苗的生长有促进作用。Mleo^[30] 等指出较强的红光有利于再生芽的出现,白光、蓝光、红光对根的再生没有明显的作用。

近年来,随着科学手段的发展,越来越多的科学家开始研究各种物理因素对组织培养的影响。阳小成^[31] 等通过用不同强度的声波刺激中华猕猴桃的组织培养试管苗,研究模拟声场的力学刺激对木本植物根系发育的生物学效应。结果表明:适度强度的声波刺激(100 dB 左右),可促进猕猴桃试管苗根系的生长发育,而根系质膜的通透性也相应降低以阻挡外界有害物质的侵入,使根系活力以及与之相关的根系总长、分根数等指标明显增强;但当声波强度超过一定范围后,对根系发育的促进效应就受到明显的抑制,当 110 dB 时,甚至开始抑制试管苗的根系发育。

3 猕猴桃组织培养的意义

猕猴桃果实含有人体必需的多种维生素、17 种氨基酸、蛋白质、果胶、矿物质和维生素 C,且在人体中利用率高达 94%。猕猴桃可鲜食,还可以做成果酱、果汁。猕猴桃的根、茎、叶、花、果都可以入药,特别是果和根在医药上有较高的利用价值。因此世界对猕猴桃的需求量增大,良种苗需求量自然也急剧增加。但另一方面,猕猴桃属雌雄异株,倍性复杂,雌雄株间花期不遇使种间杂交困难,育种周期长,且有不稳定性,给育种工作带来了难度,因此需要引进新的手段和方法进行育种。系统开展其组织培养研究具有重要的意义。首先,目前世界上猕猴桃的品种很多,但真正各方面性状都比较优秀的品种却很少,开展其组织培养研究有利于保存各种不同猕猴桃的优良性状,这些种质资源的保存为以后新优猕猴桃品种的培育奠定了基础;其次,组织培养技术在猕猴桃中的开展,有利于快速繁殖大量优质的无毒苗;其三,猕猴桃组织培养无性系的建立,给猕猴桃的外源基因转化,实现其品种改良提供了高频再生体系。

猕猴桃组织培养在近年取得了巨大进展,尤其在挽救杂种胚方面取得了较大的成功,但也存在一些问题。首先,获得的再生植株品种多,但是缺乏理论研究。其次,猕猴桃组织培养成本高,不易投入工厂化生产。再次,猕猴桃组织培养在育种上缺乏进一步研究和应用,选育各种抗性品种、转基因品种的研究仅停留在探索阶段,可应用的品种还很少。猕猴桃脱毒培养方面,国内外目前还没有相关报道。

因此,尽管对猕猴桃组织培养已经做了如此众多的研究,但仍有继续研究的必要。对猕猴桃再生植株的发生机理和进行工厂化高效再生体系研究等方面还有极大的研究前景^[32]。

参考文献

- [1] WARRINGTON J, WESTON G C. Kwifruit: Science and management[M]. Ray Richard Publisher, 1990: 183 - 204.
- [2] 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.
- [3] 朱德瑶,汪显华,万勇,等. 中华猕猴桃的组织培养研究[J]. 江西农业

- 科技,1993(4):18-19.
- [4] 洪树荣. 猕猴桃离体茎段和叶愈伤组织的诱导和植株再生[J]. 湖北农业科学,1981(9):28-30.
- [5] 贾景明, 马纯艳, 郑国. 软枣猕猴桃体细胞培养获得再生植株[J]. 沈阳师范学院学报:自然科学版,1999(4):63-65.
- [6] 郭延平, 李嘉瑞. 美味猕猴桃果实愈伤组织诱导[J]. 植物生理通讯,1991,27(2):21-24.
- [7] 汪建亚, 蒋祥娥, 河村嘉一郎. 猕猴桃试管苗愈伤组织诱导及叶片和茎段的再生[J]. 湖北林业科技,2000(增刊):91-95.
- [8] 黄贞光, 皇甫幼丽, 徐乐茵. 猕猴桃胚乳培养获得三倍体植株[J]. 科学通报,1982(4):248-250.
- [9] 桂耀林, 徐廷玉, 顾淑荣, 等. 猕猴桃胚乳培养中的胚胎发生[J]. 武汉植物学研究,1988,6(4):395-397.
- [10] 王碧琴. 不同固化物对中华猕猴桃胚乳试管苗生根的影响[J]. 江西林业科技,1997(4):24.
- [11] MACHNO DOROTA, PRZYWARA LESLAW. Endosperm culture of *Actinidia* species[J]. *Acta Biologica Gacoviensis Series Botanica*,1997,39(1):55-61.
- [12] CASSIOF, MARION G. *Orchid* fruit[J]. *Ital*,1983,67:455-464.
- [13] PAIS MSS, OLIVEIRA MM, BARROSO J. Use of petiole segments of *Actinidia chinensis* (Kw) for plant and production of friable calli for protoplasts isolation[J]. *Acta Horti*,1987,212:687-690.
- [14] MI M, OHASH H. Hartlet regeneration from protoplasts of kiwifruit, *Actinidia chinensis* plant[J]. *Japan J Breed*,1998,38:90-97.
- [15] OHASH H, MI M. Hartlet regeneration from protoplasts of Kiwifruit *Actinidia chinensis* plant[J]. *Japan J Breed*,1988,38:90-97.
- [16] 胡加金. 美味猕猴桃原生质体培养及植株再生技术研究[J]. 湖南农业大学学报,1998(6):184-190.
- [17] 刘翠云, 张小江, 马洪明. 哑特猕猴桃微繁殖工艺流程的研究[J]. 西北植物学报,1996,160(2):137-147.
- [18] 汪建亚, 蒋祥娥, 河村嘉一郎. 猕猴桃试管苗愈伤组织诱导及叶片和茎段的再生[J]. 湖北林业科技,2000(增刊):91-95.
- [19] MONELLE PL. Micropropagation of kiwifruit using non axeric shoot tips[J]. *Hart-cell-Tissue-and-organ culture*,1986,6(1):73-82.
- [20] DIMASSI T K, BCSABALI DIS A M. Effect of light, magnesium and sucrose on leaf anatomy, photosynthesis, starch and total sugar accumulation, in kiwifruit culture in vitro[J]. *Hart-cell-Tissue-and-organ culture*,1997,47,(2):127-134.
- [21] MARINO G, BATTISTINI S. Leaf callus growth, shoot regeneration and somaclonal variation in *Actinidia deliciosa* fedt of media pH[J]. *Acta Horticulturae*,1990,(280):37-44.
- [22] FAMIAN F, FERRADIN N, STANDARDI A, et al. In vitro regeneration of different *Actinidia* species[J]. *Acta - Horticulturae*,1997,444:133-138.
- [23] 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.
- [24] 张远记, 钱迎倩. 软枣猕猴桃试管苗叶片和茎段的愈伤组织诱导及植株再生[J]. 西北植物学报,1996,16(2):137-141.
- [25] 樊军锋, 李玲, 韩一凡, 等. 秦美猕猴桃叶片最佳再生系统的建立[J]. 西北植物学报,2000,22(4):907-912.
- [26] 谢志兵. 水解酪蛋白和不同碳源在猕猴桃组织培养的作用[J]. 农业与技术,2003,23(4):56-59.
- [27] 郑秀珍. 抗菌素猕猴桃组织培养的影响[J]. 湖北农业科学,1999(3):35-36.
- [28] 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.
- [29] 阳小成, 王伯初, 叶志义. 中华猕猴桃组织培养及快速繁殖[J]. 重庆大学学报:自然科学版,2003,25(6):75-77.
- [30] MLEO R, MORIN S. Effect of light quality on regeneration from callus of *Actinidia deliciosa*[J]. *Acta Horticulturae*,1990(280):155-158.
- [31] 阳小成, 王伯初, 叶梅. 不同强度的声波对猕猴桃试管苗根系发育的影响[J]. 应用与环境生物学报,2004,10(3):274-276.
- [32] 文国琴, 石大兴, 吴雪梅, 等. 猕猴桃组织培养研究的现状与进展[J]. 北方果树,2004(3):1-3.