

文章编号:1000-582X(2002)06-0075-03

中华猕猴桃的组织培养及其实用快速繁殖*

阳小成¹,王伯初¹,叶志义¹,段传人¹,车晓彦²

(1.重庆大学生物工程学院生物力学与组织工程教育部重点实验室,重庆 400044;2.四川省药品检验所,成都 610036)

摘要:简述了对木本经济植物中华猕猴桃(*Actinidia chinensis*)进行组培快繁育苗的具体方法。并针对传统组培法育苗不太重视试管苗后期的炼苗移栽等环节的不足,特别加强了对猕猴桃组培苗在成为田间商品苗之前的培育管理方法的研究,从而提高了组培苗的移栽成活率(达85%以上),本研究成果是对传统方法的改进,致力于真正提高农业生产实践中优良果木组培育苗的实际成功率。

关键词:中华猕猴桃;组织培养;育苗

中图分类号:Q949.9

文献标识码:A

植物组织培养技术自20世纪60年代以来已逐渐发展成为一门较成熟的植物快速繁殖技术,并在农业、林业、园艺等领域逐渐得到应用。但由于仍存在一些尚未解决的技术难题,妨碍了此技术在生产实践中更广泛和更大量的运用。其中尤以木本植物的组织培养育苗难度更大,如培养中经常出现的褐化和玻璃苗等现象,以及组培苗后期的生根、分根困难等问题长期困扰着科研工作者,至今木本植物组培育苗的成功率相对草本植物仍低得多。

木本植物是与人类生活关系密切、且经济价值更高的一大类群,如多种水果,优质木材和许多工业原料均来自木本植物。现实生产实践中对前者的需求相对草本植物更为迫切,尤其是我国当前正大力开展的西部山区退耕还林,三北地区和长江流域防护林体系建设等生态工程急需大量木本苗木。

商业性树木的繁殖多依赖于传统繁殖方法,如种子直接萌发为实生苗等。但木本植物由于生存期长,花龄和果龄一般也比草本植物晚得多,加之许多木本植物由于结实少,或种子萌发率低,或后代(实生苗)品质分化差异大等因素的影响,使其实生苗远远不能满足人类的需求,近年来一些生物技术已小规模地用于生产植树造林的苗木,如采取无性繁殖的扦插、嫁接和组织培养等方法,可以迅速扩大其种群^[1]。其中组培

法因具有外植体需求量少、繁殖系数高、后代品质分化小等优势而成为植物大规模快速繁殖的首选方法。

1 组培材料

中华猕猴桃(*Actinidia chinensis*)是一种经济价值较高的木质藤本植物,其果实肉厚汁多,酸甜适度,被誉为水果“维C之王”。在长江中上游地区广泛分布和人工栽种,是山区退耕还林和农民脱贫致富的优选经济植物^[2-3]。因而对猕猴桃优良种苗的市场需求量较大。

我们按常规选用中华猕猴桃的茎段作为组织培养育苗的材料(外植体)。

2 培养条件

对于猕猴桃组织培养的培养基配方,我们经过对比实验最终选用了效果最佳的培养基配方^[4]:选取MS培养基为基本培养基,并附加1~2 mg·L⁻¹ ZT(玉米素),30%蔗糖和0.75%琼脂(pH值为5.7~5.9)诱导猕猴桃愈伤组织和芽。另外,为防止在木本植物组培中容易出现的褐化现象,可在培养基中加入0.01%的抗氧化剂PVP或0.3%的活性炭。外植体在温度为25~28℃,光照12~14 h·d⁻¹,光照度2500 lx左右的条件下进行培养。继代培养的培养基配方和培养条件基本

* 收稿日期:2002-02-25

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39770206)

作者简介:阳小成(1965-),男,重庆市人,重庆大学博士生,从事植物组织工程研究。

不变,只是由于随着继代次数的增加,植物体内开始积累一定量的激素,可逐渐降低继代培养基中 ZT 的含量 ($\leq 1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)。

3 试管苗的培养

3.1 无菌试管苗的获得

植物的快速繁殖技术包括无菌培养物的建立、芽的增殖、根的诱导和试管苗的移栽 4 个环节^[5]。根据本实验室连续一年的培养研究,发现一年四季中,春季和夏季所取的猕猴桃外植体消毒灭菌相对秋、冬季要容易得多,相应组培的成功率也高得多。因此最好在每年春夏季的正午前后取猕猴桃当年生的茎段作为外植体。除去茎段上的叶片后在自来水下冲洗 1 h 左右,然后在超净工作台上对其消毒:70%酒精浸泡 30~45 s,用无菌水冲洗 1 次,再以 5%的次氯酸钠浸泡 15 min 左右,后用无菌水冲洗该茎段 3,4 次。随后置于无菌滤纸上吸干。

在超净台上用灭菌的手术刀片将茎段切成 0.5~0.8 cm 的小段,然后将其接入已配好的新鲜愈伤组织诱导培养基中(每瓶 1~3 个茎段)。之后将其移入上述给定条件的人工气候箱中进行培养。

约 7~10 d 茎段开始脱分化,在切口周围出现膨大致密的黄绿色愈伤组织(部分有腋芽的茎段可由芽直接发育成苗),20 d 左右愈伤组织一般可达 0.7~1.0 g。其表面同时开始出现不同程度的颗粒状突起,很快这些突起开始诱导分化出数量不等的芽,芽的分化率可达 90%以上。(经计数测定,每块愈伤组织可产生 4~8 个最终可发育成苗的有效芽)不定芽产生后生长较快,从肉眼可辨开始,约 2~3 周即可长成高 2~3 cm 的试管苗,分化出 3~5 片幼叶。

3.2 快速继代繁殖

采取 2 种途径进行愈伤组织的快速继代繁殖。

1) 将已诱导分化出芽的猕猴桃愈伤组织切成数量不等但大小相近的小块,分别接种到配方同诱导培养基(或仅减少 ZT 的含量至 $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 以下)的继代培养基中进行增殖培养。

2) 将已长至约 5 cm 的无菌试管苗的茎段和叶柄作为外植体,切成 0.4 cm 左右长的小段,接种至继代培养基中,再脱分化产生愈伤组织和诱导出芽,从而实现试管苗的继代增殖。

通过对比实验发现,途径 1) 的继代增殖效果较

好,周期也相对较短。建议选用。在正常情况下,每增殖一代约需 1 个月左右,增殖系数可达 4~5。

3.3 诱导生根

可采用瓶内生根和瓶外生根的方法促进试管苗根系发生及其功能的恢复。

3.3.1 瓶内生根

试管苗长至 3~5 cm 即可切下生根。将新梢基部浸入已灭菌的 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 IBA 溶液中 40~60 min,然后转入无激素的 1/2MS 培养基中。约 2~3 周在梢的基部切口附近出现不定根,4~6 周时根的数量可达 10 根以上,且出现次级分根,逐渐在培养基中形成网状的根系。此法的生根率可达 80%。

3.3.2 瓶外生根

将切下的猕猴桃新梢在 $50 \sim 100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 IBA 溶液(不需灭菌)中浸泡约 1 h,然后直接移入装有细沙并淋透了已稀释 10 倍的 MS 培养基的大量元素营养母液的小花盆中,并在其上扣上透光通气且保湿的大号培养皿,以防此时柔弱的无根苗因失水而枯死。约 1 周后即可发现在苗的基部出现几个白色的不定根突起,随后根逐渐延伸并长入沙土中吸收水分和养分。

瓶外生根法可将生根及对苗的驯化(炼苗)结合起来,它既可降低育苗成本,又可提高移栽成活率,且简化了育苗程序,因而也更具有推广应用价值。

4 炼苗与移栽

试管苗移栽至大田是木本植物组培技术从实验室阶段过渡到有应用价值的工厂化育苗阶段的关键环节。因为试管苗在人工培养箱和三角瓶中恒温、高湿、低光、异养等特殊环境下增殖与生长,使其形态解剖结构和生理特性与在温室大棚、特别是野外条件下生长的植株有很大不同。为适应移栽后相对恶劣多变的自然环境条件,必须要对试管苗进行一个逐步锻炼和适应的过程,即进行炼苗,随后移栽至野外才能确保有较高的成活率。

所以,在已生根的试管苗移栽前,应尽量通过逐渐开瓶炼苗驯化,使其强壮化,诱导组培苗茎叶保护组织的发生和恢复其气孔开闭的水气调节功能。

炼苗的主要方法为:打开瓶口→降温→增光。

而试管苗移栽的一般步骤为:人工气候箱→温室大棚→大田

可见,试管苗逐级移栽的过程实际上也可看作一个炼苗的过程。这两者是紧密地联系在一起的。一般

炼苗 20 d 左右即可移栽到基质以腐质土为主的盆钵中,通过这一过程,可使试管苗的最终成活率达到 85% 以上,而传统方法仅有 60% ~ 70% 的苗木成活率。

上述组培育苗各步骤可以如下示意图表示:

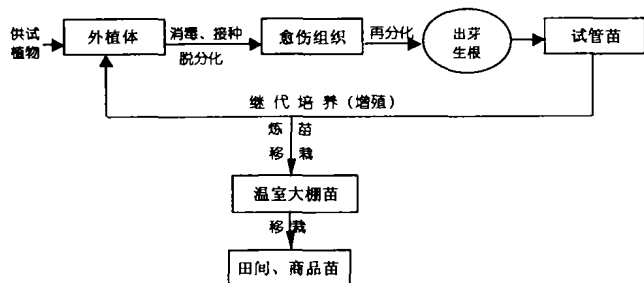


图 1 猕猴桃实用快速繁殖技术路线示意图

5 意义与进展

由于猕猴桃雌雄异株,且其中约 70% 是雄株,资源调查中选出的优良单株因实生苗易发生高度分离而不宜用种子繁殖,用传统的枝接法和嫁接法也因材料有限而难以快速大量繁殖,而用组培法则可以弥补上述不足,是一个较理想的快速繁殖方法。

关于猕猴桃的组织培养,前人有过一些相关的报道^[4,6],但一般研究的重心多停留在培育试管苗的实验室阶段。而对于组培苗后期的生根、炼苗、移栽等关系到育苗成功率的实用技术环节的关注显得不够。本研究对其加以深入,突出对组培育苗后期工作的重视,致力于真正提高组培快繁育苗的实际成功率。

参考文献:

- [1] BAKER F W G 主编. 速生树种的快速繁殖[M]. 沈惠娟译. 北京: 中国农业出版社, 1994.
- [2] 王栋, 刘中申, 肖盈. 国内外猕猴桃的研究及应用进展[J]. 中医药信息, 1995, 4: 29 - 31.
- [3] 孟艳玲. 保健果品猕猴桃[J]. 资源节约和综合利用, 1999, 3: 51 - 52.
- [4] 曹孜义, 刘国民. 实用植物组织培养技术教程[M]. 兰州: 甘肃科学技术出版社, 1996.
- [5] 中国科学院上海植物生理研究所, 上海植物生理学会编. 现代植物生理指南[M]. 北京: 科学出版社, 1999.
- [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.

Tissue Culture and Rapid Propagation of *Actinidia chinensis*

YANG Xiao - cheng¹, WANG Bo - chu¹, YE Zhi - yi¹, DUAN Chuan - ren¹, CHE Xiao - yan²

(1. College of Bioengineering, Key Lab for Biomechanics & Tissue Engineering under the State Ministry of Education, Chongqing University, Chongqing 400044, China; 2. Sichuan Provincial Institute of Drug Control, Chengdu 610036, China)

Abstract: It has been briefly studied and reported that *Actinidia chinensis*, one of economic woody plants, has been bred with the method of plant tissue culture. Aim at the shortage of traditional plant tissue culture ways which ignored the refinement and transplant of test - tube seedling, it strengthen the study to breeding and management of *Actinidia chinensis* seedlings before they grow up and become mature seedlings. Through our explore, the transplant survive rate of tissue - culture seedlings attain to about 85%. This study is the improvement to traditional breeding seedling means and it is helpful to the rapid propagation of those economic woody plants.

Key words: *Actinidia chinensis*; plant tissue culture; breed seedling

(责任编辑 李胜春)