

‘秦美’猕猴桃叶片高频直接再生体系的建立^①

张艳玲^{1,2}, 吴秀华¹, 周 月¹,
唐澄莹^{1,2}, 何 夫^{1,2}, 汤绍虎^{1,2}

1. 西南大学 三峡库区生态环境教育部重点实验室, 重庆 400715; 2. 西南大学 生命科学学院, 重庆 400715

摘要: 以‘秦美’猕猴桃无菌苗叶片为外植体, 通过不定芽诱导、继代增殖和生根培养基的筛选, 建立高频直接再生体系。结果表明, 叶片出芽最佳培养基为 MS+5.0 mg/L 6-BA+0.2 mg/L NAA, 40 d 出芽率达 100%, 每个叶盘平均出芽 7.4 个; 不定芽继代增殖最佳培养基为 MS+5.0 mg/L 6-BA+0.2 mg/L NAA+0.1 mg/L GA₃, 每 30 d 继代 1 次, 1~5 代平均繁殖系数达 6.43; 不定芽生根最佳培养基为 1/2 MS+0.7 mg/L IBA, 30 d 生根率为 91.11%。在土壤营养钵中, 试管苗 30 d 移栽成活率达 92.47%。本试验成功建立了‘秦美’猕猴桃的叶片高频直接再生体系, 为其遗传转化奠定了基础。

关 键 词: ‘秦美’猕猴桃; 叶片; 再生; 遗传转化

中图分类号: S663.4

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2016)02-0020-05

猕猴桃为水果之王^[1], 栽培品种较多, 主要为中华猕猴桃和美味猕猴桃^[2]。‘秦美’猕猴桃是我国在 20 世纪末选育出的美味猕猴桃品种, 具抗旱耐寒、丰产和果实耐贮等优点^[3], 是国内种植面积最大(40%以上)的猕猴桃品种^[4]。其果肉绿色, 质地细腻, 汁多味美^[5]。但猕猴桃在生产中常常遭遇严重病害, 影响产量和品质。如猕猴桃细菌性溃疡病在短期内可造成大面积树体死亡^[6-7], 严重时减产 50%以上, 果实变小或畸形^[7]。单纯依靠常规育种和喷洒农药难以有效克服猕猴桃的病害问题^[8], 通过抗病基因的遗传转化和基因工程育种可望得到解决。

离体再生体系的建立是植物遗传转化的基础^[9]。叶盘法是农杆菌介导的遗传转化中最成熟、最常用的一种方法, 其关键问题是建立高效成熟的叶片再生系统^[10]。迄今, 关于‘秦美’猕猴桃的离体再生已有一些报道^[10-17]。其中, 部分通过脱分化和再分化实现再生^[11-13], 因分步再生历时较长, 会降低转化频率; 部分由叶片直接出芽再生^[10, 14-17], 但对再生不定芽仅少数以低代次进行^[15, 17], 而多数未进行继代培养^[10, 14, 16], 使转基因植株的整体增殖效率可能较低或不确定。本试验以‘秦美’猕猴桃叶片为外植体, 通过不定芽诱导、继代增殖和生根建立高频再生体系, 为其遗传转化奠定基础。

1 材料和方法

1.1 试验材料

试验材料为‘秦美’猕猴桃(*Actinidia deliciosa* cv. Qinmei)无菌苗, 由西南大学三峡库区生态环境教育部重点实验室植物生理研究室保存。

① 收稿日期: 2014-11-25

基金项目: 国家自然科学基金项目(31370317)。

作者简介: 张艳玲(1989-), 女, 重庆万州人, 硕士研究生, 主要从事植物生理与分子生物学的研究。

通信作者: 汤绍虎, 教授。

1.2 不定芽诱导与继代培养

在无菌条件下, 切除叶片的叶缘、叶尖, 再将其切成大小约 $0.5 \times 0.5 \text{ cm}^2$ 的叶盘, 然后背面朝下接种在含 6-BA 和 NAA 的不定芽诱导培养基中(表 1). 暗培养 30 d, 光照培养 10 d(共 40 d)后, 统计不定芽诱导率(出芽率)和不定芽数量. 每个培养基接种外植体 21 个(7 个/皿), 重复 3 次. 分离、切割丛芽, 将生长良好、大小基本相同(长约 1 cm)的单个不定芽接种到含 6-BA, NAA 和 GA_3 的不定芽继代培养基中(表 2), 培养 30 d 后统计不定芽繁殖系数(增殖后不定芽总数/接种不定芽数). 每个培养基接种外植体 9 个(1 个/瓶), 重复 3 次.

1.3 不定芽生根与试管苗移栽

无菌条件下, 分离、切割丛芽, 选取生长良好、大小基本相同(长约 2 cm)的单个不定芽接入含 IBA 或 NAA 的 1/2 MS 培养基中, 30 d 后统计生根率、不定根长度和数量. 每个培养基接种不定芽 9 个(3 个/瓶), 重复 3 次. 生根结束后, 将根系发达、生长健壮的试管苗(高 3 cm 以上)的培养瓶从培养室移至温室内, 炼苗 3~5 d. 取出试管苗, 洗净根部琼脂后移栽到营养钵中, 常规日常管理. 营养钵基质为田园土与河沙的混合物(体积比 3:1). 前 7 d 覆膜保湿, 30 d 后统计移栽成活率.

1.4 培养条件与数据处理

所用基本培养基为 MS(生根时为矿质元素减半的 1/2 MS), 含 30 g/L 蔗糖, 7 g/L 琼脂, pH 值为 5.8. 不定芽诱导阶段暗培养, 其他光照培养. 光照强度 $20 \sim 40 \text{ mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ (12 h/d), 培养温度 $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$. 试验数据利用 SPSS 12.0 软件计算均值和进行统计分析, 结果用 Excel 2003 制表、作图.

2 结果与分析

2.1 ‘秦美’猕猴桃不定芽的诱导

试验结果(表 1)表明, 叶盘在各诱导培养基中培养 40 d 后, 出芽率在 46% 以上, 每叶盘出芽数在 3.5 个以上(不定芽长度普遍在 1 cm 以上). 其中, B_5 和 B_6 培养基出芽率最高(100%), 与 B_2 , B_3 和 B_7 差异有统计学意义($p \leq 0.05$), B_1 , B_4 次之, B_2 最低. B_6 培养基出芽数最多, 与其他培养基差异有统计学意义, 且实际状况为茎叶嫩绿、生长健壮. 因此, ‘秦美’叶片最佳出芽培养基为 B_6 培养基, 即 $\text{MS} + 5.0 \text{ mg/L } 6\text{-BA} + 0.2 \text{ mg/L NAA}$.

叶盘接种后(图 1-A), 7 d 左右开始膨大, 叶脉和切口处膨大明显; 20 d 左右开始出现点状不定芽, 之后逐渐增多、伸长; 30 d 后可见明显浅绿色的小芽(图 1-B). 光照培养 10 d 后, 不定芽颜色变深(图 1-C).

表 1 植物生长调节剂对‘秦美’猕猴桃叶片直接出芽的影响

培养基编号	6-BA/ ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	NAA/ ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	接种叶盘数/ 个	出芽叶盘数/ 个	出芽率/ %	出芽数/ ($\text{个} \cdot \text{叶盘}^{-1}$)
B_1	2.0	0.1	63	60	$95.24 \pm 1.24\text{a}$	6.0b
B_2	2.0	0.5	63	29	$46.03 \pm 2.42\text{c}$	3.5d
B_3	3.0	0.1	63	45	$71.43 \pm 2.93\text{b}$	3.8d
B_4	3.0	0.2	63	62	$98.41 \pm 0.30\text{a}$	5.0c
B_5	4.0	0.2	63	63	$100 \pm 0.00\text{a}$	6.2b
B_6	5.0	0.2	63	63	$100 \pm 0.00\text{a}$	7.4a
B_7	6.0	0.2	63	47	$74.60 \pm 0.29\text{b}$	4.3cd

2.2 ‘秦美’猕猴桃不定芽的继代培养

连续 5 代的继代培养结果表明, 在不同继代培养基中, 不定芽的繁殖系数和生长状态差异有统计学意义(表 2).

在 6 个培养基中, P_3 培养基的不定芽增殖效果最好, 1~5 代平均繁殖系数最高(6.43), 虽与 P_4 培养基差异无统计学意义($p > 0.05$), 但其丛芽生长情况最好(表 2, 图 1-D). 所以, ‘秦美’不定芽最佳增殖培养基为 P_3 培养基, 即 $\text{MS} + 5.0 \text{ mg/L } 6\text{-BA} + 0.2 \text{ mg/L NAA} + 0.1 \text{ mg/L } \text{GA}_3$.

2.3 ‘秦美’猕猴桃不定芽的生根

试验表明, 培养基中不同 NAA 和 IBA 质量浓度对‘秦美’不定芽生根有显著影响(表 3), 整体上 IBA

的生根效果较好, 生根率较高, 不定根较多、较长. 其中, R₅ 培养基生根效果最好, 30 d 生根率最高 (91.11%), 每芽生根数最多 (6.44 条), 不定根最长 (2.7 cm). 故其不定芽生根的最佳培养基为 1/2 MS+ 0.7 mg/L IBA.

在生根过程中, 不定芽 10 d 后开始产生不定根, 15 d 左右形态明显, 之后迅速伸长, 30 d 形成发达根系 (图 1-E). 试验中发现, 不定芽在不含 NAA, IBA 的 1/2 MS 基本培养基中几乎不生根, 添加 NAA 或 IBA 后, 生根率和生根数等显著提高和增加.

表 2 不同继代培养基对‘秦美’猕猴桃不定芽增殖的影响

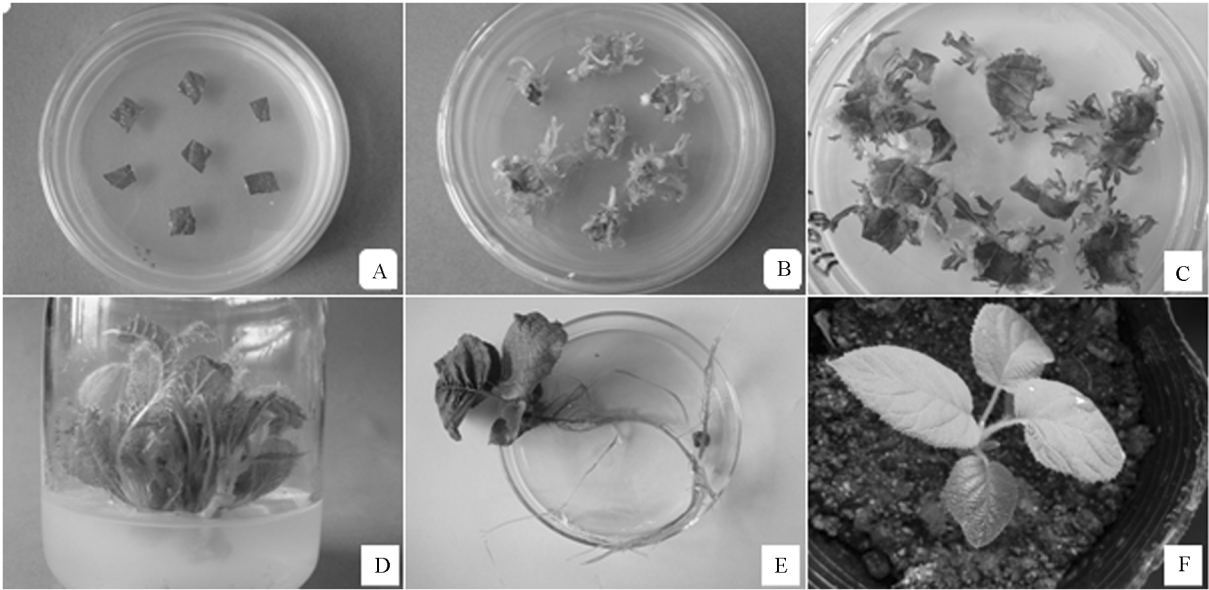
培养基 编号	6-BA/ (mg·L ⁻¹)	NAA/ (mg·L ⁻¹)	GA ₃ / (mg·L ⁻¹)	各代繁殖系数					平均繁殖系数	丛芽生长状态
				1	2	3	4	5		
P ₁	3.0	0.2	0.1	6.00	4.75	3.50	3.56	3.01	4.16±0.54bc	芽密集、叶嫩绿、长势良
P ₂	4.0	0.2	0.1	6.17	4.88	3.58	3.24	3.11	4.20±0.58b	芽稀疏、叶嫩绿、长势差
P ₃	5.0	0.2	0.1	6.87	6.59	6.51	6.28	5.88	6.43±0.14a	芽密集、叶嫩绿、长势旺
P ₄	3.0	0.4	0.1	7.17	6.13	5.08	4.82	4.67	5.57±0.47a	芽密集、叶嫩绿、长势良
P ₅	4.0	0.4	0.1	4.50	4.00	3.50	3.58	3.32	3.78±0.21c	芽稀疏、叶深绿、长势差
P ₆	5.0	0.4	0.1	7.17	5.25	3.33	3.20	2.92	4.37±0.81b	芽密集、叶嫩绿、长势良

表 3 NAA 和 IBA 质量分数对‘秦美’猕猴桃不定芽生根的影响

培养基 编号	IBA/ (mg·L ⁻¹)	NAA/ (mg·L ⁻¹)	接种芽数/ 个	生根芽数/ 个	生根率/ %	生根数/ (条·芽 ⁻¹)	根长/ (cm·根 ⁻¹)
R ₁	0	0.6	45	37±0.29ab	82.22±1.81ab	4.82±0.07bcd	2.2±0.61abc
R ₂	0	0.7	45	34±0.72b	75.56±4.80b	4.42±0.05cd	1.8±0.18c
R ₃	0	0.8	45	38±0.37ab	84.44±1.52ab	5.77±0.08bc	2.0±0.24bc
R ₄	0.6	0	45	37±0.70ab	82.22±0.98ab	6.24±0.05a	2.5±0.30ab
R ₅	0.7	0	45	41±0.27a	91.11±0.72a	6.44±0.04a	2.7±0.05a
R ₆	0.8	0	45	38±0.52ab	84.44±1.35ab	5.36±0.09bc	2.6±0.12a

2.4 ‘秦美’猕猴桃试管苗的炼苗与移栽

试管苗经炼苗后移植到营养钵中. 共移栽 93 株试管苗, 30 d 后存活 86 株, 成活率达 92.47%, 且生长良好 (图 1-F).



A: 刚接种的叶片; B: 叶片暗培养 30 d 再生的不定芽; C: 光照培养 10 d 后的不定芽; D: 由单个不定芽增殖 30 d 形成的丛芽; E: 生根 30 d 后的不定芽; F: 移栽到营养钵中 30 d 存活的试管苗.

图 1 ‘秦美’猕猴桃叶片的植株再生

3 讨 论

对于猕猴桃的组织培养,除了阔叶猕猴桃^[18]和葛枣猕猴桃^[19-20]外,近年来国内主要对中华猕猴桃、国外主要对美味猕猴桃进行了研究,但繁殖效率普遍较低^[2]。

叶片直接再生,可经短暂或不经愈伤阶段直接出芽^[21]。在现有猕猴桃相关报道中,普遍经历了愈伤阶段,且存在出芽时间长、出芽率低和出芽数少等问题。例如,中华猕猴桃‘伏牛 95-2’培养 40 d 后的出芽率和出芽数分别为 87.5%和 4.2 个^[22],‘红阳’60 d 分别为 99.33%和 5.2 个^[23]。在美味猕猴桃中,有的 60 d 出芽率和出芽数分别为 80%和 1.2 个^[10];有的 30 d 分别为 100%和 9.33 个^[14];有的逾 21 d 分别为 100%和 15 个^[16]。在含继代培养的报道中,‘Tomuri’60 d 出芽率和出芽数分别为 80%和 15 个,1~2 代平均繁殖系数为 14^[15];‘海沃德’40 d 分别为 80.95%和 8.89 个,1~3 代平均繁殖系数为 6.38^[17]。本试验‘秦美’40 d 出芽率和出芽数分别为 100%和 7.4 个,1~5 代平均繁殖系数达 6.43。

在本试验中,叶片出芽时间较短(40 d),出芽率高(100%),出芽数较多(7.4 个),尤继代次数最高,1~5 代平均繁殖系数达 6.43,说明不定芽能较长时间稳定增殖。因此,在相同转化条件下,既可保证较高的转化频率,又能保障转基因植株获得后以较高效率增殖扩繁。当然,本试验更高代次的繁殖系数还需考查,丛芽继代培养基还需优化和继续筛选,以进一步提高再生体系的整体繁殖效率,从而为‘秦美’的遗传转化提供更好的叶片直接再生系统。

在植物组培过程中,不同种类的植物生长调节剂及同种调节剂的不同质量浓度都会影响猕猴桃的植株再生^[12]。在我们对美味猕猴桃的研究中,‘海沃德’最佳出芽培养基为 MS+3.0 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA^[17],本试验‘秦美’为 MS+5.0 mg/L 6-BA+0.2 mg/L NAA;而其最佳增殖培养基分别为 MS+3.0 mg/L 6-BA+0.2 mg/L NAA+0.1 mg/L GA₃^[17]和 MS+5.0 mg/L 6-BA+0.2 mg/L NAA+0.1 mg/L GA₃。原因是不同品种的基因型不同,其离体出芽、增殖对细胞分裂素(6-BA)和生长素(NAA)质量分数和比值的要求不同。

4 结 论

试验结果表明,‘秦美’叶片 40 d 直接出芽率达 100%,每叶盘平均出芽 7.4 个;不定芽 1~5 代平均繁殖系数达 6.43(每 30 d 继代 1 次);30 d 生根率达 91.11%。试管苗移栽成活率达 92.47%。本试验成功建立了‘秦美’猕猴桃叶片高频直接再生体系,为其遗传转化奠定了基础。

参考文献:

- [1] 汪克强,周建峰,王晓兵.红阳猕猴桃的栽培与管理[J].陕西林业科技,2010(5):68-71.
- [2] 赵许朋,周 月,杨 立,等.“红阳”猕猴桃茎段高效再生体系的建立[J].西南大学学报(自然科学版),2013,35(2):6-10.
- [3] 吴家森,林海萍,潘 月,等.秦美猕猴桃果实生育及营养量变的若干特点[J].浙江林学院学报,2002,19(3):244-246.
- [4] 邓 雷,韩志峰,牟文良,等.二氧化氯固体缓释剂对货架期内‘秦美’猕猴桃品质的影响[J].农学学报,2012,2(6):68-71.
- [5] 张有平,张清明.美味猕猴桃新品种——秦美[J].中国果树,1987(4):29-30.
- [6] 高小宁,赵志博,黄其玲,等.猕猴桃细菌性溃疡病研究进展[J].果树学报,2012,29(2):262-268.
- [7] 金平涛,冯 华,吕 岩.猕猴桃溃疡病的发生特点和综合防治技术[J].植保技术与推广,2003,23(8):27-28.
- [8] 周 月,赵许朋,吴秀华,等.农杆菌介导 *LJAMP2* 基因导入‘红阳’猕猴桃及分子鉴定[J].生物工程学报,2014,30(6):931-942.
- [9] 宋 波,张兴国,苏承刚,等.大豆胚芽尖再生体系的建立[J].西南师范大学学报(自然科学版),2010,35(1):128-131.
- [10] 樊军锋,李 玲,韩一凡,等.秦美猕猴桃叶片最佳再生体系的建立[J].西北植物学报,2002,22(4):907-912.
- [11] 葛新玲,朱立武.猕猴桃高效离体再生体系的研究[J].中国农学通报,2008,24(10):373-376.

- [12] 袁云香. 秦美猕猴桃高频遗传转化再生体系的建立 [J]. 湖北农业科学, 2011, 50(14): 2993—2994, 2998.
- [13] 袁云香. 铜离子对猕猴桃愈伤组织再分化培养的研究 [J]. 吉林农业科学, 2013, 38(1): 65—66, 79.
- [14] TIAN N, XU Z Q, HE J G. Establishment of High Frequency and Direct Regeneration System of Kiwifruit (*Actinidia deliciosa* Qinmei) [J]. Journal of Wuhan Botanical Research, 2007, 25(1): 79—83.
- [15] PRADO M J, GONZALEZ M V, ROMO S, et al. Adventitious Plant Regeneration on Leaf Explants from Adult Male Kiwifruit and AFLP Analysis of Genetic Variation [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2007, 88(1): 1—10.
- [16] 周玲艳, 秦华明, 赖幸韵, 等. 猕猴桃实生苗再生体系的建立 [J]. 广西植物, 2009, 29(4): 514—517.
- [17] 吴秀华, 张艳玲, 周 月, 等. ‘海沃德’猕猴桃叶片高频直接再生体系的建立 [J]. 植物生理学报, 2013, 49(8): 759—763.
- [18] BI J H, LIU Y L, ASGHAR S. In vitro Organogenesis and Plant Regeneration from Leaf Explants of *Actinidia latifolia* [J]. Journal of Fruit Science, 2005, 22(4): 405—408.
- [19] SUGAWARA F, YAMAMOTO N, TANAKA O. Plant Regeneration in in vitro Culture of Leaf, Stem and Petiole Segments of *Actinidia polygama* Miq [J]. Plant Tissue Culture Letters, 1994, 11(1): 14—18.
- [20] TAKAHASHI W, SUGAWARA F, YAMAMOTO N, et al. Plant Regeneration in *Actinidia polygama* Miq. by Leaf, Stem, and Petiole Culture with Zeatin, and from Stem-Derived Calli on Low-Sucrose Medium [J]. Journal of Forestry Research, 2004, 9(1): 85—88.
- [21] 陈 华, 李 平, 刘 晶, 等. 药蒲公英再生体系的建立和优化 [J]. 生物工程学报, 2005, 21(2): 244—249.
- [22] 尚霄丽, 马春华, 冯建灿, 等. 中华猕猴桃叶片再生体系的建立 [J]. 江西农业学报, 2010, 22(4): 50—52.
- [23] 隆前进, 吴延军, 谢 鸣. ‘红阳’猕猴桃叶片和带芽茎段的组织培养快繁技术 [J]. 浙江农业学报, 2010, 22(4): 429—432.

Establishment of a High-Frequency and Direct Regeneration System from Leaf of ‘Qinmei’ Kiwifruit

ZHANG Yan-ling^{1,2}, WU Xiu-hua¹, ZHOU Yue¹,
TANG Cheng-ying^{1,2}, HE Fu^{1,2}, TANG Shao-hu^{1,2}

1. Key Laboratory of Eco-Environments in Three Gorges Reservoir Region, Ministry of Education, Southwest University, Chongqing 400715, China;

2. School of Life Science, Southwest University, Chongqing 400715, China

Abstract: In order to establish a high-frequency and direct regeneration system for ‘Qinmei’ kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) and lay a foundation for its genetic transformation, the leaves of this cultivar were used as explants to establish the regeneration system through adventitious bud induction, proliferation and rooting. The results showed that the maximum regeneration frequency of adventitious buds was as high as 100%, and one leaf disc, on the average, produced 7.4 adventitious buds on the medium MS+5.0 mg/L 6-BA+0.2 mg/L NAA. The optimum medium for adventitious bud multiplication was MS+5.0 mg/L 6-BA+0.2 mg/L NAA+0.1 mg/L GA₃, with an average multiplication coefficient of 6.43 from the first to the sixth generation. 1/2 MS+0.7 mg/L IBA was the most suitable for the rooting of the regenerated adventitious buds, the rooting rate being 91.11%. Having transplanted into soil for 30 days, 92.47% of the regenerated plantlets survived.

Key words: ‘Qinmei’ kiwifruit (*Actinidia deliciosa*); leaf; regeneration; genetic transformation

