

## 软枣猕猴桃种苗离体快繁

赵康举, 申林彬, 郁琴红, 殷领梅, 叶桃, 黄燕芬\*

贵州师范学院生物科学学院, 贵州 贵阳

收稿日期: 2022年3月18日; 录用日期: 2022年4月19日; 发布日期: 2022年4月27日

### 摘要

为优化软枣猕猴桃种苗快繁技术体系, 以其茎段、芽作为外植体, 开展不同激素配比组合的MS培养基对愈伤组织诱导及增殖、不定芽分化增殖、无菌苗生根和驯化移栽等实验研究。结果表明, 茎段外植体表面消毒时长6~7 min, 在MS + 0.2 mg/L 2,4-D + 0.4 mg/L 6-BA + 蔗糖30 g/L + 琼脂粉7.8 g/L培养基上愈伤组织诱导率最高, 达93.75%, 且愈伤组织生长旺盛, 呈白绿色湿润疏松状; 在MS + 1.3 mg/L 6-BA + 0.25 mg/L NAA软枣猕猴桃初代培养芽苗诱导率、增殖率最高, 达到93.75%, 在MS + 2.0 mg/L 6-BA + 1.2 mg/L NAA培养基上增殖效率最高, 达到86.6%, 增殖系数达到5左右; 最佳生根培养基为1/2MS + 1.5 mg/L NAA, 生根率93.75%, 并且每株有4~10条根, 根粗苗壮; 根长3.0~5.0 cm的再生植株移栽到草炭: 园土: 珍珠岩 = 2:2:1的混合基质中, 成活率达86%以上。

### 关键词

软枣猕猴桃, 诱导分化增殖, 植株再生, 移栽

## Soft Jujube Kiwi Fruit Seedlings in Vitro and Rapid Propagation

Kangju Zhao, Linbin Shen, Qinhong Yu, Lingmei Yin, Tao Ye, Yanfen Huang\*

College of Biological Sciences, Guizhou Normal University, Guiyang Guizhou

Received: Mar. 18<sup>th</sup>, 2022; accepted: Apr. 19<sup>th</sup>, 2022; published: Apr. 27<sup>th</sup>, 2022

### Abstract

In order to optimize the rapid propagation technology system of soft jujube kiwi fruit seedlings, the stem segment and bud were used as explants to carry out experimental studies on callus induction and proliferation, adventitious bud differentiation and proliferation, roots and acclimation and transplanting of sterile seedlings on MS medium with different hormone ratios. The re-

\*通讯作者。

sults showed that the callus induction rate reached 93.75% on MS medium with 0.2 mg/L 2,4-D + 0.4 mg/L 6-BA + sucrose 30 g/L + AGAR powder 7.8 g/L after surface disinfection for 6~7 min, and the callus growth was very strong and showed white green moist loose shape; The induction rate and proliferation rate of kiwi soft jujube in MS + 1.3 mg /L 6-BA + 0.25 mg/L NAA reached 93.75%, and the proliferation rate of kiwi soft jujube in MS + 2.0 mg/L 6-BA + 1.2mg /L NAA reached 86.6%. The multiplication coefficient reached about 5. The optimal rooting medium was 1/2MS + 1.5 mg/L NAA, the rooting rate was 93.75%, and each plant had 4~10 roots, thick and strong roots. The regenerated plants with root length of 3.0~5.0 cm were transplanted into the mixture of peat: garden soil: perlite = 2:2:1, and the survival rate was over 86%.

## Keywords

Soft Jujube Kiwi Fruit, Induced Differentiation and Proliferation, Plant Regeneration, Transplanting

Copyright © 2022 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## 1. 引言

软枣猕猴桃(*Actinidia arguta* Planch.)属猕猴桃科多年生落叶藤本植物,是我国珍贵的抗寒果树资源,具有较高的营养保健及经济价值[1]-[7]。韩国从20世纪90年代就开始了软枣猕猴桃品种筛选工作;2015年国内冯健、曾凡顺[8]等论述了目前软枣猕猴桃苗木繁育主要依靠扦插进行繁殖;2018年,孙阳、陈喜忠[9]等发表了《辽宁省软枣猕猴桃发展现状、存在问题及建议》。虽然我国软枣猕猴桃资源非常丰富,但开发利用非常少,到目前为止选育的软枣猕猴桃品种只有魁绿、丰绿、辽丹-134这三个及辽恒-8301两个品系[10],但在栽培技术方面进行了大量的研究工作。软枣猕猴桃不仅利用休眠枝扦插繁殖[11],还可进行绿枝扦插繁殖[12]、硬枝水扦插育苗[13];张远记[14]从软枣猕猴桃试管苗茎段和叶片诱导出愈伤组织并得到再生植株、软枣猕猴桃果实的生长曲线为双S型[15]、赵淑兰等对软枣猕猴桃花芽形态分化时期进行了详细的观察和描述[16]。国内目前虽然在实验室已经有建立起软枣猕猴桃的组织培养技术体系,但是在生产上采用组织培养技术的仍未见报道。由于现有软枣猕猴桃的快繁技术较为单一,限制了我国的软枣猕猴桃的种苗生产规模,市场上经驯化软枣猕猴桃种苗产品数量极其有限。从20世纪70年代开始,组织培养技术育苗已成为猕猴桃繁育优良品种的重要方法[17][18],可以保证高质量种源的高效培育。因此,将组织培养技术应用于软枣猕猴桃优良种苗快繁,加强软枣猕猴桃种苗繁育技术的研究和推广工作,使软枣猕猴桃的种苗生产达到规模化、设施化技术水平,具有良好的推广应用前景。本试验主要以软枣猕猴桃的茎段、芽为材料,研究最适愈伤组织及芽苗诱导分化、增殖、生根培养基,并探讨适宜的移栽条件,优化软枣猕猴桃组织培养快繁技术体系,提高种苗的繁殖速率。

## 2. 材料与方法

### 2.1. 材料、仪器和试剂

#### 2.1.1. 供试材料

带芽的软枣猕猴桃健壮枝条。材料取自贵阳白云黔花香种植养殖专业合作社。

### 2.1.2. 主要仪器

LDZX-50KBS 立式压力蒸汽灭菌器, 上海向帆仪器有限公司; SW-CJ-2FD 型双人单面净化工作台, 苏州净化设备有限公司; LT502E 电子天平, 常熟市天量仪器有限责任公司; PHSJ-3F 实验室 PH 计, 上海仪电科学仪器股份有限公司。

### 2.1.3. 试剂

6-BA, NAA、IBA、2,4-D、琼脂粉、蔗糖以、MS 固体培养基, 上海博微生物科技有限公司产品。

## 2.2. 实验方法

### 2.2.1. 材料表面消毒时间对初代培养的影响

取软枣猕猴桃健壮无病虫害的带芽枝条, 流水冲洗 1 d 后用 75% 的酒精涮洗 30 s, 再用 1% 的升汞表面消毒, 设置 5 种表面消毒时间: 4 min、5 min、6 min、7 min、8 min; 无菌水清洗后沥干水分, 接种于 MS + 2,4-D 0.2 mg/L + 6-BA 0.4 mg/L 蔗糖 30 g/L + 琼脂粉 7.8 g/L 培养基中培养, 探寻材料表面消毒时间对初代培养的影响。

### 2.2.2. 初代培养

将软枣猕猴桃枝条腋芽(侧芽)和顶芽直接切下, 茎段切割厚度约为 0.2-0.5 cm, 芽和茎段接种至(1)-(6)号初代培养基中置于培养室进行培养, 筛选最佳初代培养基配方。

1) MS + 1.0 mg/L 6-BA + 0.5 mg/L IAA; 2) MS + 1.5 mg/L 6-BA + 0.5 mg/L IAA; 3) MS + 2.0 mg/L 6-BA + 0.5 mg/L IAA; 4) MS + 0.5 mg/L 6-BA + 0.5 mg/L NAA; 5) MS + 1.0 mg/L 6-BA + 0.5 mg/L NAA; 6) MS + 1.5 mg/L 6-BA + 0.5 mg/L NAA。

培养基 pH 为 5.8~6.0, 每种培养基接种 15 瓶, 每瓶接种 1 个外植体。在培养室温度为 24℃~26℃; 光周期为 10 h 光照/14h 黑暗; 相对湿度为 45%~60%; 光照度为 1500~2000 LX 培养一周, 每 2 d/次观察统计褐化率、成活率和污染率、愈伤组织诱导率、芽分化率等。

### 2.2.3. 继代增殖培养

从初代培养建立的无性系中选出生长势好的壮苗和愈伤组织进行继代增殖培养, 培养条件同初代培养, 每处理接种 15 瓶, 每 2 d/次观察计算增殖周期、增殖倍数等。

### 2.2.4. 愈伤组织诱导分化芽苗增殖培养

筛选质地疏松, 颜色鲜绿的愈伤组织进行切割转接, 诱导分化培养, 经再分化得到再生芽苗。分化培养基参照继代增殖培养基。pH 5.8~6.0, 每处理接种 15 瓶, 培养条件同初代培养, 每 1~2 d 观察一次。

### 2.2.5. 生根培养

挑选继代增殖培养后长势好的再生壮苗作为生根培养的材料, 生根培养基采用: 1) 1/2 MS + 0.1 mg/L IBA + 2.0 g/L 活性炭; 2) 1/2 MS + 0.3 mg/L IBA + 2.0 g/L 活性炭; 3) 1/2 MS + 0.6 mg/L IBA + 2.0 g/L 活性炭; 4) 1/2 MS + 0.9 mg/L IBA + 2.0 g/L 活性炭, 培养条件同初代培养。培养 3 周, 观察生长情况, 统计生根数, 生根率, 污染率, 成活率等, 筛选优化生根培养基配方。

### 2.2.6. 驯化移栽

挑选发根多, 生长旺盛, 苗高度不超过 1.5 cm、根长小于 0.5 cm 的组培苗进行驯化移栽。移栽基质选用体积比为草炭: 园土: 珍珠岩 = 2:2:1 的混合基质。移栽后用透明膜覆盖, 遮光率不高于 60%, 空气湿度不低于 40%, 环境温度保持在 15℃~28℃, 以达到光照合适、保温、保湿效果。生长几周后, 统计成活率、生根率。

### 3. 结果与分析

#### 3.1. 表面消毒时间对软枣猕猴桃初代培养的影响

由表 1 可以看出,腋芽(侧芽)、顶芽、茎段外植体随灭菌时间的增加,存活率、芽分化率、愈伤组织诱导率也都随着增加,但达到一定时间后便随着灭菌时间的增加而降低。当灭菌时间为 6~7 min 时,存活率、芽分化率、愈伤组织诱导率均达到最大值。

**Table 1.** Screening of optimal explant surface disinfection time

**表 1.** 最适外植体表面消毒时间的筛选

灭菌时长(min)	接种外植体数(个)	外植体存活率(%)	芽分化率(%)	愈伤组织诱导率(%)
4	44	34.09	27.28	79.55
5	32	37.50	31.25	81.25
6	39	74.36	64.10	89.74
7	32	71.19	62.50	87.50
8	32	21.88	15.63	78.13

#### 3.2. 培养基对外植体诱导分化增殖的影响

##### 3.2.1. 初代培养

由表 2 可以看出,软枣猕猴桃初代培养与 6-BA 和 NAA 都有关系。当 6-BA 浓度一致时,随着 NAA 浓度增加软枣猕猴桃初代培养芽苗诱导率和愈伤组织诱导率也跟着增加;当 NAA 浓度一致时,随着 6-BA 浓度增加软枣猕猴桃初代培养芽苗诱导率和愈伤组织诱导率反而降低;当 6-BA/NAA 约为 1:2 时,软枣猕猴桃初代培养芽苗诱导率最高;表 2 中最适培养基为 A2: MS + 1.3 mg/L 6-BA + 0.25 mg/L NAA 和 A3: MS + 0.8 mg/L 6-BA + 0.25 mg/L NAA。

**Table 2.** Effects of medium formula on primary culture of soft jujube kiwi fruit

**表 2.** 培养基配方对软枣猕猴桃初代培养的影响

培养基编号	培养基配方(mg/L)	接种外植体数(个)	芽苗诱导率(%)	愈伤组织诱导率(%)
A1	MS + 1.36-BA + 0.15 NAA	32	31.25	75.00
A2	MS + 1.36-BA + 0.25 NAA	32	62.50	93.75
A3	MS + 0.86-BA + 0.15 NAA	32	71.88	90.63
A4	MS + 0.86-BA + 0.25 NAA	32	28.13	65.63

##### 3.2.2. 继代增殖培养

表 3 显示,芽苗增殖率和愈伤组织增殖率与 6-BA、NAA 和 IBA 都有关系。当 6-BA 浓度一致时,随着 NAA 浓度升高芽苗增殖系数、愈伤组织增殖率也跟着增加;6-BA 和 NAA 浓度都增加时,芽苗增殖系数、愈伤组织增殖率也跟着增加;当 6-BA/NAA 和 6-BA/IBA 比约为 2:1 时,愈伤组织增殖率和芽苗增殖系数最高;最佳增殖培养基为 3: MS + 2.0 mg/L 6-BA + 1.2 mg/L NAA 和 4: MS + 3.0 mg/L 6-BA + 1.5 mg/L IBA。

**Table 3.** Effect of hormone level on proliferation of soft jujube kiwi fruit**表 3.** 激素水平对软枣猕猴桃增殖效果的影响

培养基编号	激素水平 (mg/L)	接种芽苗数(芽)	增殖芽苗数(芽)	接种愈伤组织数(块)	增殖愈伤组织数(块)	芽苗增殖系数	愈伤组织增殖率(%)
1	MS + 1.0 6-BA + 0.4 NAA	15	45	32	18	2.97	56.25
2	MS + 1.0 6-BA + 0.8 NAA	15	46	30	22	3.05	73.33
3	MS + 2.0 6-BA + 1.2 NAA	15	70	30	26	4.65	86.67
4	MS + 3.0 6-BA + 1.5 IBA	15	73	26	21	4.85	80.77
5	MS + 2.0 6-BA + 0.8 IBA	15	49	28	19	3.25	67.86

### 3.2.3. 生根培养

从表 4 可以看出,生根率和 NAA 的浓度有关。当 NAA 浓度增加时生根率也随着增加,但是达到一定浓度后生根率就会降低,可见 NAA 浓度对软枣猕猴桃根的诱导具有一定的抑制作用,最适生根培养基为 1/2MS + 1.5 mg/L NAA。

**Table 4.** Rooting medium selection**表 4.** 生根培养基筛选

培养基编号	培养基配方(mg/L)	接种不定芽数(芽)	生根不定芽数(个)	生根率(%)
I	1/2MS + 1.0 NAA	16	14	87.50
II	1/2MS + 2.0 NAA	16	12	75.00
II	1/2MS + 1.5 NAA	16	15	93.75

### 3.2.4. 驯化移栽

由表 5 看出,软枣猕猴桃驯化移栽成活率与移栽基质配比有关。当草炭:珍珠岩 = 1:1 时,随着园土基质增加时,移栽称呼哦了反而降低;当园土:珍珠岩 = 1:1 时,随着草炭基质增加时,移栽成活率跟着增加;当草炭:园土 = 2:2 时,随着珍珠岩基质增加,移栽成活率反而降低。得出最佳驯化移栽基质配比为草炭:园土:珍珠岩 = 2:2:1,移栽成活率高达 86.6%。

**Table 5.** Screening of acclimation and transplantation substrates**表 5.** 驯化移栽基质筛选

编号	基质配比	移栽盆数(盆)	成活盆数(盆)	成活率(%)
1	草炭:园土:珍珠岩 = 1:1:1	15	6	40.0
2	草炭:园土:珍珠岩 = 1:2:1	15	4	26.7
3	草炭:园土:珍珠岩 = 2:2:1	15	13	86.6
4	草炭:园土:珍珠岩 = 2:1:1	15	5	33.3
5	草炭:园土:珍珠岩 = 2:2:2	15	8	53.3

## 4. 结论与讨论

实验结果表明, 灭菌时长为 6~7 min 时软枣猕猴桃茎段在存活率、芽苗诱导率、愈伤组织诱导率均高于比其他灭菌时间, 为最适灭菌时长; 初代培养基 MS + 1.3 mg/L 6-BA + 0.25 mg/L NAA 和 MS + 0.8 mg/L 6-BA + 0.15 mg/L NAA 对软枣猕猴桃芽苗和愈伤组织诱导率最高, 分别达到 93.75% 和 90.63%; 在继代增殖培养基 MS + 2.0 mg/L 6-BA + 1.2 mg/L NAA 和 MS + 3.0 mg/L 6-BA + 1.5 mg/L IBA 上增殖效率最高, 达到 86.67% 和 80.77%, 增殖系数达到 5 左右, 增殖周期为 15~16 d; 最佳生根培养基为 1/2MS + 1.5 mg/L NAA, 生根率达 93.75%, 并且每株有根数可达 4~10 条, 根粗苗壮; 根长 3.0~5.0 cm 的再生苗, 移栽到草炭: 园土: 珍珠岩 = 2:2:1 的混合基质中, 成活率达 86% 以上。实验中还发现, 在切割转接愈伤组织时, 如果愈伤组织块底部出现褐变, 可在底部留一层薄薄的褐变层, 这样更有利于愈伤组织块在新鲜培养基上的扩繁, 这一现象的发生机制有待进一步的研究探明。

植物组织培养技术具有生育周期短、不会受到季节限制的特点, 利用组织培养技术繁育软枣猕猴桃种苗, 既可以提高繁殖速度, 又可以增加种苗数量, 并且有利于对野生种质资源的保存、驯化及利用, 但是愈伤组织和不定芽的诱导是组织培养再生体系建立中最关键的一步, 如何在最短的时间、利用最低的成本获得最高的再生效率是组培育苗的重要研究内容[19] [20] [21], 而外源激素的选择、浓度调整及综合利用对愈伤组织和不定芽再生与增殖起着至关重要的作用[22] [23] [24] [25]。本实验虽然利用经优化的技术成功初步建立软枣猕猴桃组织培养快繁体系, 但希望后续能从基因表达等方面深入探寻一套更适合软枣猕猴桃组织培养快繁技术体系, 进一步提升软枣猕猴桃种苗规模化繁殖的效益。

## 基金项目

教育部大学生创新创业计划项目“软枣猕猴桃产业发展——种苗快速繁殖技术研究”[202014223036]。

## 参考文献

- [1] 赵春莉, 汤昊, 姚思扬, 等. 响应面法优化软枣猕猴桃组培增殖培养基[J]. 吉林农业, 2019(2): 64-66.
- [2] 郑小华. 软枣猕猴桃茎、叶离体培养与植株再生的研究[D]: [硕士学位论文]. 雅安: 四川农业大学, 2008.
- [3] 王禹. 软枣猕猴桃组织培养快繁体系的建立[J]. 中国林副特产, 2020, 164(1): 21-23.
- [4] 陈翀, 徐力. 基于网络药理学的藤梨根治疗胃癌前病变机制探究[J]. 世界中医药, 2020, 15(21): 3184-3190.
- [5] 滕坤, 张海丰, 臧皓, 等. 藤梨根甲醇提取物的抗氧化活性及物质基础初步研究[J]. 中草药, 2019, 51(18): 4384-4388.
- [6] 杨誉佳, 陆远富, 安强, 等. 藤梨根提取物对宫颈癌的抑制作用[J]. 中华中医药学刊, 2019, 37(7): 1710-1714.
- [7] 袁古治. 藤梨根水提取物对人肺癌细胞增殖抑制的影响[J]. 中医临床研究, 2019, 11(10): 34-36.
- [8] 冯健, 曾凡顺, 王嘉, 李程. 软枣猕猴桃良种选育研究进展[J]. 安徽农业科学, 2015(15): 56-57, 97.
- [9] 孙阳, 陈喜忠, 李仁浩, 刘振盼, 刘广平, 尤文忠, 白云松. 辽宁经济林产业发展状况调研(三)——辽宁省软枣猕猴桃发展现状、存在问题及建议[J]. 辽宁林业科技, 2018(6): 47-49.
- [10] 巩文红, 李志强, 李汉友. 我国猕猴桃优异资源的评价[J]. 山西果树, 2005, 107(5): 23-24.
- [11] 黄祥童, 杨野, 刘俐, 等. 野生软枣猕猴桃休眠枝扦插试验[J]. 林业科技, 1995, 20(4): 39-41, 28.
- [12] 赵淑兰, 李继海, 屈慧鸽, 等. 软枣猕猴桃绿枝扦插繁殖及快速成苗试验[J]. 特产研究, 1999(4): 46-47, 59.
- [13] 谷钟声, 张锡崇, 刘克武, 等. 软枣猕猴桃硬枝水扦插育苗的研究[J]. 中国林副特产, 1990, 15(4): 1-3.
- [14] 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.
- [15] 苍晶, 王学东, 张达, 等. 软枣猕猴桃果实生长发育的研究[J]. 东北农业大学学报, 2004, 35(1): 77-83.
- [16] 赵淑兰, 王玉兰, 孙宪忠, 等. 软枣猕猴桃花芽形态分化时期观察[J]. 中国果树, 1996(2): 25-26.

- [17] 严姜黎, 张翼, 邢梅, 等. 红肉猕猴桃离体快速繁殖技术研究[J]. 华中农业大学学报, 2008, 27(1): 101-104.
- [18] Bahar, S.O. and Hikmet, B. (2018) Application of Tissue Culture and Transformation Techniques in Model Species *Brachypodium distachyon*. *Brachypodium Genomics*, **1667**, 289-310. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7278-4\\_18](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7278-4_18)
- [19] 颜世伟. 陕西省猕猴桃产业现状及发展瓶颈的研究[D]: [硕士学位论文]. 西安: 西北农林科技大学, 2011.
- [20] 林静芳. 林木组织培养的现状与展望[J]. 林业科技通讯, 1988(4): 1-4.
- [21] 马欢. 组织培养快速繁殖猕猴桃苗木的研究[D]: [硕士学位论文]. 合肥: 安徽农业大学, 2015.
- [22] 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.
- [23] 张远记, 钱迎倩. 毛花猕猴桃愈伤组织诱导与植株再生[J]. 广西科学, 1994, 1(4): 1-5.
- [24] 高敏霞, 冯新, 赖瑞联, 等. 猕猴桃组织培养研究进展[J]. 东南园艺, 2017, 5(3): 50-56.
- [25] 龙茹, 秘树青, 王子华, 等. 外源激素对软枣猕猴桃硬枝扦插生根的影响[J]. 河北科技师范学院学报, 2010, 24(2): 12-15.