

# 猕猴桃属(*Actinidia*)植物的离体种质保存\*

陈维伦 郭东红 安和祥 朱至清  
(中国科学院植物研究所, 北京 100093)

**摘要** 本文研究了猕猴桃属植物离体种质资源保存的方法。在一年中于盛夏时采取的植物材料在离体培养时能得到最好的效果,改进的剥离茎尖的方法使污染率大大降低,在MS附加BA 0.5, Z 0.1, GA 0.1~0.5 mg/L,蔗糖3%,琼脂0.55%的培养基中茎尖生长良好并且不产生不定芽。通过茎尖培养方法已保存了10多个种,40多个猕猴桃的离体种质。

**关键词** 离体种质保存,猕猴桃

**In vitro conservation of *Actinidia*/CHEN Wei-Lun, GUO Dong-Hong, AN He-Xiang, ZHU Zhi-Qing**  
**Abstract** This paper deals with the methods for in vitro conservation of *Actinidia*. Early summer was the best time to obtain the plant materials. The contamination rate was greatly decreased by using a improved technology to excise the shoot tips and the shoot tips grew well and had no adventitious shoot formation in MS medium supplemented with BA 0.5, Z 0.1, GA 0.1~0.5 mg/L. Up to date, about 12 species and more than 40 clones of *Actinidia* plants have been conserved in vitro.

**Key words** in vitro, germplasm conservation, *Actinidia*

**Author's address** Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093

由于猕猴桃的特殊风味、丰富的营养和较高的经济价值,它已成为国际上重要的温带水果,近年来在我国也有较大的发展。猕猴桃属(*Actinidia*)植物约有60多种,绝大部分的种为我国特有种,并且还有许多变种<sup>[1]</sup>,它们是猕猴桃育种的珍贵种质资源。我国在猕猴桃野生种质资源的收集和异地保护中已做了大量工作,但田间保存受自然条件限制,需要花费较多的土地和人力。离体种质保存方法不受季节气候变化和自然灾害的影响,可免除病虫害的侵害,在极为有限的空间里长期保存种质资源,在国内外种质交流时极其便利,需要时可通过微繁殖技术(micropropagation)获得批量的植株供育种和生产使用;并且离体材料也是进行猕猴桃生物技术研究,细胞、基因工程育种和超低温保存的基础材料。

本研究是中国科学院典型培养物保藏委员会(Type Culture Collection, Chinese Academy of Sciences 简称 TCC CAS)所属植物离体种质库(筹)的部分工作,其目的是建立猕猴桃属植物离体种质资源保存的技术方法,在此基础上收集保存猕猴桃属植物的野生种,优良栽培品种(适合于鲜食、加工、制罐等),特殊基因型(如红肉、无毛、雌雄同株和耐贮等性状)以及目前国内生产中较为忽视的优良雄株材料,以满足猕猴桃生产育种和生物技术研究的需要。

为使所保存的离体种质能用于生产和研究,必须达到以下要求(1)要保持保存材料的遗传稳定性。虽然猕猴桃可以从愈伤组织<sup>[2]</sup>、叶片<sup>[3]</sup>、胚乳<sup>[4]</sup>和原生质体<sup>[5]</sup>经器官发生或体细胞胚胎发生再生植株,但一般选择茎尖培养的方法<sup>[6]</sup>,利用侧芽进行继代和增殖,以防止变异。(2)需保证培养物不为微生物所污染。(3)要有较长的继代培养时间,以省工、省时而减

少转移时的损失。(4)在需要时能够通过微繁技术得到批量的植株。

## 1 材料和方法

### 1.1 植物材料

主要取自本所植物园猕猴桃组的田间,少数直接来自新西兰,在不同季节取一年生枝条的腋芽作材料。

### 1.2 材料的消毒

用枝剪将枝条剪成2 cm左右带一个腋芽的切段,放入烧杯,加几滴洗洁精加水振荡,然后用自来水冲洗半小时左右,冲洗干净的切段先用70%酒精浸泡半分钟再转移到无菌杯中用0.1%的 $HgCl_2$ 消毒7~8 min,最后用无菌水洗3~4次。

### 1.3 培养基

用MS培养基作为基本培养基<sup>[7]</sup>。

### 1.4 培养条件

在茎尖培养时,培养室保持 $25^{\circ}C \pm 1^{\circ}C$ ,光照强度1000 Lx,全日(24小时)光照。在保存培养物时,培养箱保持在 $17^{\circ}C \pm 1^{\circ}C$ ,光照强度500 Lx,12小时光照。

## 2 结果和讨论

### 2.1 获取材料的时间对茎尖培养的影响

从1996年到1997年我们分别于1996年10月18日~11月13日、1997年3月20日~3月24日、1997年7月14日和1997年8月26日4次采取实验材料进行茎尖培养,其茎尖培养成功的种数/取材的种数分别为 $10/27 = 37\%$ 、 $9/34 = 26\%$ 、 $8/8 = 100\%$ 、 $6/9 = 66\%$ 。一年四季中以盛夏时取材的成功率最高,此时植株生长最为旺盛,接种后基本不发生褐变,培养物生长迅速,而且污染率极低。

### 2.2 接种时剥取茎尖的方法

一般进行猕猴桃茎尖培养时首先要将材料(芽)的鳞片和较大的幼叶逐层剥除,最终再切取适当大小的茎尖(包括生长锥和少量幼叶,长度约在2~3 mm左右)。由于大多数猕猴桃的芽带有多毛的鳞片和外层幼叶,而它们往往是带菌的,材料表面消毒时消毒溶液又不易渗入其中,在由外向内逐层剥取时极易将外部的微生物带进内部而导致茎尖培养物的污染,这在多毛的种(或品种)中更为严重,常导致实验的完全失败。我们在接种时先将整个芽沿基部切下,此时在切下的芽的切面上可见到茎尖基部,然后用尖头的解剖刀(11号刀片)从内部挖出茎尖,这样可避免操作时器械接触到鳞片和外部幼叶。用这种方法不但降低了污染率,而且简化了操作过程,在各种猕猴桃上均得到了满意的结果。在将芽切下时要掌握好切的深浅程度,以使茎尖的基部正好在切下的芽的切面上暴露出来,如切得过浅易将生长锥切除,过深时茎尖部分仍深埋在芽内不易切取。

### 2.3 培养基和培养及保存的条件

在进行离体种质保存时,希望保存的材料不产生不定芽以免导致变异。已知玉米素对猕猴桃培养物的生长有益,但在浓度较高时又易诱导产生不定芽,在我们的实验中培养基附加玉米素的浓度控制在0.1 mg/L时,绝大多数材料生长良好,而又不产生不定芽,在茎尖培养时使用MS培养基附加BA 0.5 Z 0.1,GA 0.1~0.5 mg/L,蔗糖3%,琼脂0.55%(日本进口分装)。在培养成功后,为保存材料(在培养箱中)可将琼脂浓度提高到0.8%~0.9%,以延缓培养物

的生长。一般用这种方法继代时间可延长到3~6月。在保存培养基中还去除了玉米素,以进一步防止不定芽的形成而导致遗传变异。到目前为止有的材料已保存一年半左右,有的还只有数月。在继代过程中只要注意无菌操作基本上不会导致污染的发生。

在1996~1997年的一年多时间内我们共取材50多个号(包括品种、种无性系),共成功40多个。说明上述方法对大多数猕猴桃属植物是适宜的,但对个别种的取材时间、培养基和培养条件还需进一步摸索。另外,为了进一步延长继代培养的时间,除培养基成份之外,还要研究在更低温度时(如0℃到5℃)保存种质的可能性和可行方法(对保存材料繁殖后田间存活率及其遗传变异情况也需做进一步研究)。目前所保存的猕猴桃属植物的数量还只占其中一部分,还需进一步扩大,以满足生产和科研要求。

表1 离体保存的猕猴桃属(*Actinidia*)种质

Table 1 *Actinidia* germplasm by in vitro conservation

序号 No.	名称 Name	性别 Sex	拉丁学名 Name of Species
1	密云软枣猕猴桃	雌(♀)	<i>A. arguta</i> var. <i>Miyun</i>
2	密云软枣猕猴桃	雄(♂)	<i>A. arguta</i> var. <i>Miyun</i>
3	山西软枣猕猴桃	雌(♀)	<i>A. arguta</i> cv. <i>Shanxi</i>
4	魁绿猕猴桃	雌(♀)	<i>A. arguta</i> cv. <i>Kuilu</i>
5	紫果猕猴桃	雌(♀)	<i>A. arguta</i> var. <i>purpurea</i>
6	紫果猕猴桃	雄(♂)	<i>A. arguta</i> var. <i>purpurea</i>
7	陕西猕猴桃	雄(♂)	<i>A. arguta</i> var. <i>giraldii</i>
8	红毛猕猴桃	雌(♀)	<i>A. rufa</i>
9	黑蕊猕猴桃	雌(♀)	<i>A. melanandra</i>
10	黑蕊猕猴桃	雄(♂)	<i>A. melanandra</i>
11	狗枣猕猴桃	雌(♀)	<i>A. kolomikta</i>
12	狗枣猕猴桃	雄(♂)	<i>A. kolomikta</i>
13	葛枣猕猴桃	雌(♀)	<i>A. polygama</i>
14	葛枣猕猴桃	雄(♂)	<i>A. polygama</i>
15	对萼猕猴桃	雄(♂)	<i>A. valvata</i>
16	大籽猕猴桃	雌(♀)	<i>A. macrosperma</i>
17	长叶猕猴桃	雄(♂)	<i>A. hemsleyana</i>
18	毛花猕猴桃	雄(♂)	<i>A. eriantha</i>
19	中华猕猴桃 80号	雌(♀)	<i>A. chinensis</i> No. 80
20	中华猕猴桃 246号	雌(♀)	<i>A. chinensis</i> No. 246
21	中华猕猴桃 110号	雄(♂)	<i>A. chinensis</i> No. 110
22	中华猕猴桃 36号	雌(♀)	<i>A. chinensis</i> No. 36
23	中华猕猴桃 28号	雄(♂)	<i>A. chinensis</i> No. 28
24	中华猕猴桃华光 11号	雌(♀)	<i>A. chinensis</i> cv. <i>Hua Guang</i> No. 11
25	中华猕猴桃 79-1	雌(♀)	<i>A. chinensis</i> cv. 79-1
26	中华猕猴桃 79-2	雌(♀)	<i>A. chinensis</i> cv. 79-2
27	中华猕猴桃 79-3号	雌(♀)	<i>A. chinensis</i> cv. 79-3
28	红1号猕猴桃	雌(♀)	<i>A. chinensis</i> No. 1
29	红2号猕猴桃	雌(♀)	<i>A. chinensis</i> cv. <i>Xin Hong</i> No. 2
30	红3号猕猴桃	雌(♀)	<i>A. chinensis</i> No. 3
31	秦美猕猴桃	雌(♀)	<i>A. deliciosa</i> cv. <i>Qinmei</i>
32	海瓦德猕猴桃	雌(♀)	<i>A. deliciosa</i> cv. <i>Hayward</i>

表 1(续) Table 1 (continued)

33	海瓦德猕猴桃	雄(♂)	<i>A. deliciosa</i> cv. Hayward
34	琼斯猕猴桃	雌(♀)	<i>A. deliciosa</i> cv. Jones
35	日本大果猕猴桃	雌(♀)	<i>A. deliciosa</i> cv. Japan big fruit
36	美味猕猴桃 26 号	雌(♀)	<i>A. deliciosa</i> No. 26
37	美味猕猴桃 247 号	雌(♀)	<i>A. deliciosa</i> No. 247
38	美味猕猴桃 73 号	雄(♂)	<i>A. deliciosa</i> No. 73
39	M 121 号猕猴桃	雌雄(♀、♂)	<i>A. deliciosa</i> cv. M121
40	D <sub>2</sub> E <sub>6</sub> 猕猴桃	雌雄(♀、♂)	<i>A. deliciosa</i> cv. D <sub>2</sub> E <sub>6</sub>
41	科植 1 号(杂种)	雌(♀)	<i>A. deliciosa</i> No. 26 × <i>A. arguta</i> (hybrid)
42	科植 2 号(杂种)	雌(♀)	<i>A. deliciosa</i> cv. Hayward × <i>A. eriantha</i> (hybrid)
43	III-1(杂种)	雄(♂)	<i>A. deliciosa</i> cv. Hayward × <i>A. eriantha</i> (hybrid)
44	III-5(杂种)	雄(♂)	<i>A. deliciosa</i> cv. Hayward × <i>A. eriantha</i> (hybrid)
45	86-5-9(杂种)	雄(♂)	<i>A. deliciosa</i> cv. Hayward × <i>A. eriantha</i> (hybrid)
46	E-Col-01	雄(♂)	48-2-17C

## 参 考 文 献

- 1 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志. 北京: 科学出版社, 1984 49(第二分册) 205 ~ 267
- 2 Murashige T, Skoog F. A revised medium for medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant*, 1962, 15: 473 ~ 479
- 3 Barbieri C, Morini S. Plant regeneration from *Actinidia* callus cultures. *Hortic. Sci.*, 1987 62(1): 107 ~ 109
- 4 Oliveira M M, Pais M S S. Somatic embryogenesis in leaves and leaf-derived protoplasts of *Actinidia deliciosa* var. *deliciosa* cv. Hayward (kiwifruit). *Plant Cell Rep.*, 1992, 11(5-6): 314 ~ 317
- 5 Kin M S, Fraser L G, Harvey C F. Initiation of callus and regeneration of plantlets from endosperm of *Actinidia* interspecific hybrids. *Sci. Hortic.*, (Amst.) 1990, 44(1-2): 107 ~ 117
- 6 Margarida Olivra M, Pais M S S. Plant regeneration from protoplasts of long-term callus cultures of *Actinidia deliciosa* var. *deliciosa* cv. Hayward (kiwifruit). *Plant Cell Rep.*, 1991, 9(11): 643 ~ 646
- 7 Shen X S et al. Propagation *in vitro* of Chinese gooseberry (*Actinidia chinensis*) through the development of axillary buds. *Sci Hortic.*, (Amst.) 1990, 42(1-2): 45 ~ 54