

## 秋水仙碱对猕猴桃愈伤组织分化的影响

龙自立<sup>1</sup>, 张慧琴<sup>2</sup>, 刘永立<sup>1\*</sup>

(1. 浙江大学农业与生物技术学院, 浙江杭州 310058; 2. 浙江省农业科学院园艺研究所, 浙江杭州 310021)

**摘要** [目的]探讨秋水仙碱对猕猴桃愈伤组织分化的影响。[方法]利用组织培养技术,研究秋水仙碱的不同浓度和处理时间对愈伤组织分化率和不定芽数量的影响。[结果]秋水仙碱对猕猴桃愈伤组织不定芽分化率有很大的影响。阔叶猕猴桃愈伤组织在秋水仙碱 0.05% 下处理 24 h, 其不定芽分化率达 100%, 而对照为 58.33%。在 0.50% 秋水仙碱浓度下处理 24 h, 海沃德愈伤组织的不定芽分化率达到最高为 75%。金桃胚乳愈伤组织不定芽分化率达到最大时的秋水仙碱浓度为 0.20%, 处理时间为 24 h。[结论]秋水仙碱处理对猕猴桃再生芽数的影响因猕猴桃种类而异, 海沃德再生芽数的最佳组合: 0.20% 的秋水仙碱处理 24 h; 阔叶猕猴桃再生芽数的最佳组合: 0.05% 的秋水仙碱处理 24 h。

**关键词** 猕猴桃; 愈伤组织; 秋水仙碱; 诱导; 不定芽

中图分类号 S 663.4 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2020)16-0049-03

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2020.16.013



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

## Effect of Colchicine on Tissue Differentiation of Kiwifruit

LONG Zi-li<sup>1</sup>, ZHANG Hui-qin<sup>2</sup>, LIU Yong-li<sup>1</sup> (1. College of Agriculture & Biotechnology, Zhejiang University, Hangzhou, Zhejiang 310058; 2. Institute of Horticulture, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou, Zhejiang 310021)

**Abstract** [Objective] To investigate the effect of colchicine on the differentiations of callus of kiwifruit. [Method] The effects of different concentrations and treatment times of colchicine on callus differentiation rate and number of adventitious buds were studied. [Result] Colchicine had a great effect on the rate of adventitious bud differentiation in kiwifruit. The rate of adventitious bud differentiation of *Actinidia latifolia* was 100% by 0.05% colchicine treatment for 24 hours, while the control was 58.33%; treated with 0.50% colchicine for 24 hours, the rate of adventitious bud differentiation of Hayward callus reached 75%. The differentiation rate of Jintao adventitious buds reached the maximum by 0.20% colchicines treatment for 24 hours. [Conclusion] The effect of colchicine treatment on the regeneration bud number of kiwifruit varied with kiwifruit species. The best combination of Hayward regeneration bud number was colchicine concentration of 0.20% for 24 h; the best combination of *Actinidia latifolia* regeneration bud number was 0.05% colchicine for 24 h.

**Key words** Kiwifruit; Callus; Colchicine; Induction; Adventitious bud

在植物诱变育种中,利用秋水仙碱进行诱变育种是一种传统的手段,且在许多植物诱变育种中均有报道,如葡萄<sup>[1]</sup>、厚皮甜瓜<sup>[2]</sup>、大葱<sup>[3-4]</sup>、阔叶风铃草<sup>[5]</sup>、白萝卜<sup>[6]</sup>、甘草<sup>[7]</sup>以及油菜<sup>[8]</sup>等。近年来利用组织培养与秋水仙碱诱导相结合的方法,进行诱变育种日趋成熟,以达到改良作物品种的目的。在猕猴桃的倍性诱导方面,徐靓<sup>[9]</sup>以二倍体中华猕猴桃(*Actinidia chinensis* Planch.)品种‘脐红’、山梨猕猴桃(*Actinidia rufa* Planch.)与毛花猕猴桃(*Actinidia eriantha* Benth.)杂交后代 SM 及‘红阳’(*Actinidia chinensis* Planch.)×毛花猕猴桃杂交后代 HM 为材料,利用秋水仙素对 3 个材料进行多倍体诱导试验。但利用胚乳进行猕猴桃诱变的研究目前尚未见报道。笔者以猕猴桃金桃品种(*Actinidia chinensis* cv. ‘Jintao’)、海沃德品种(*Actinidia deliciosa* cv. ‘Hayward’)的胚乳以及阔叶猕猴桃(*Actinidia latifolia*)的组培苗为材料进行研究,以期明确秋水仙碱对不同猕猴桃品种再分化的影响规律并获得有价值的猕猴桃多倍体材料。

## 1 材料与方

**1.1 试验材料** 以海沃德(*Actinidia deliciosa* cv. ‘Hayward’) ( $2n=6x=174$ )猕猴桃和金桃品种(*Actinidia chinensis* cv. ‘Jin-

tao’ ( $2n=4x=116$ ))的胚乳愈伤组织以及阔叶猕猴桃(*Actinidia latifolia*)的组织培养试管苗为材料,使用 BBI 公司生产的秋水仙碱进行试验。

**1.2 试验方法** 取海沃德和桃金猕猴桃品种的果实,洗净后用自来水冲洗 30 min,用 75% 乙醇灭菌 1 min 后再用 0.2% HgCl<sub>2</sub> 消毒 20 min,然后灭菌水冲洗 3 次。在超净工作台内,取二者胚乳接种在灭菌后的 1/2MS+1 mg/L 2,4-D+3 mg/L BA 培养基上进行愈伤组织诱导。阔叶猕猴桃材料选取组培苗叶柄切成约 0.5 cm 长后接种在上述培养基中进行愈伤组织诱导。

上述得到的愈伤组织在无菌的秋水仙素溶液(0.01%、0.05%、0.10%、0.20%、0.50%)分别处理 24、48、72、96 h,以蒸馏水为对照。海沃德和金桃胚乳愈伤组织的再分化培养基: 1/2MS+0.1 μmol/L NAA+5 μmol/L BA+20 g/L;阔叶猕猴桃叶柄愈伤组织的再分化培养基: 1/2MS+0.5 mg/L NAA+3 mg/L BA。培养 45 d 时进行统计,并用 DPS 7.05 软件进行数据分析。

## 2 结果与分析

**2.1 秋水仙碱对猕猴桃愈伤组织不定芽分化率的影响** 从表 1 可以看出,秋水仙碱处理后猕猴桃愈伤组织不定芽分化率的变化有很大的随机性,但也表现出一定的规律性。随着秋水仙碱处理浓度的增加和处理时间的加大,猕猴桃愈伤组织不定芽分化率呈明显下降趋势。这说明过高浓度的秋水仙碱处理对猕猴桃愈伤组织的再分化有一定的抑制作用。

**基金项目** 浙江省农业新品种选育重大科技专项“猕猴桃新品种选育”(2016C02052-7-2);玉环市科技局项目“猕猴桃抗病砧木培育及应用推广”。

**作者简介** 龙自立(1983—),男,广西桂林人,硕士研究生,研究方向:园艺植物分子育种。\*通信作者,教授,博士,硕士生导师,从事园艺植物生物技术研究。

**收稿日期** 2020-01-11

其中在高浓度和长时间处理的组合条件下(72 h、96 h; 0.20%、0.50%),猕猴桃愈伤组织在接种培养基5 d后,组织开始出现失绿和水渍状,生长也受到严重影响;在接种培养基15 d左右,愈伤组织全部死亡或部分死亡。

在秋水仙碱适当浓度和一定时间的组合条件下,不同猕猴桃愈伤组织的分化率比对照有所提高(表1)。其中在0.05%浓度下处理24 h,阔叶猕猴桃愈伤组织的不定芽分化

率达100%,而对照为58.33%,二者有显著差异。在0.50%秋水仙碱浓度情况下处理24 h,海沃德胚乳愈伤组织的不定芽分化率为75%,而对照仅为25%。从金桃胚乳愈伤组织不定芽分化率看,在秋水仙碱浓度0.2%处理24 h下达到最高为75%,而对照仅为16.67%。由此可见,适当浓度的秋水仙碱对猕猴桃愈伤组织不定芽分化率也有一定的促进作用。

表1 秋水仙碱处理后不同猕猴桃愈伤组织的不定芽分化率

Table 1 Adventitious bud differentiation rate of different callus of kiwifruit after colchicine treatment

组别 No.	处理时间 Time//h	处理浓度 Concentration//%	不定芽分化率 Adventitious bud differentiation rate//%		
			海沃德 CEH	金桃 CEJ	阔叶猕猴桃 CPAL
0	0	0.00	25.00	16.67	58.33
1	24	0.01	58.33	16.67	66.67
2	24	0.05	66.67	16.67	100.00
3	24	0.10	66.67	25.00	50.00
4	24	0.20	58.33	75.00	33.33
5	24	0.50	75.00	25.00	25.00
6	48	0.01	41.67	25.00	50.00
7	48	0.05	33.33	16.67	91.67
8	48	0.10	66.67	58.33	50.00
9	48	0.20	66.67	50.00	33.33
10	48	0.50	58.33	25.00	16.67
11	72	0.01	66.67	50.00	41.67
12	72	0.05	33.33	25.00	33.33
13	72	0.10	41.67	16.67	33.33
14	72	0.20	16.67	0.00	0.00
15	72	0.50	0.00	0.00	0.00
16	96	0.01	41.67	8.33	16.67
17	96	0.05	33.33	16.67	25.00
18	96	0.10	16.67	16.67	0.00
19	96	0.20	0.00	0.00	0.00
20	96	0.50	0.00	0.00	0.00

注:数据为转入分化培养基45 d后统计

Note: Data were taken after 45 d culture

**2.2 秋水仙碱对猕猴桃愈伤组织再生芽数的影响** 从表2可以看出,秋水仙碱对不同猕猴桃愈伤组织分化的再生芽数有明显的影。在浓度为0.20%的秋水仙碱处理24 h下,海沃德胚乳愈伤组织的平均再生芽数达最高为6.29个。对于金桃胚乳愈伤组织的平均再生芽数,秋水仙碱处理对其影响不显著(表2)。秋水仙碱处理对阔叶猕猴桃叶柄愈伤组织再生芽数有明显的影,即在秋水仙碱浓度为0.05%,处理时间为24 h下,平均再生芽数为7.58个,达到最大值;而对照为3.71个。由此可知,秋水仙碱处理对猕猴桃再生芽数的影响因猕猴桃种类而异。

### 3 讨论

在植物组织培养中利用秋水仙碱进行多倍体诱导已经有过许多尝试,并被证明是一种较有效的手段<sup>[10-14]</sup>。该试验从秋水仙碱对猕猴桃愈伤组织不定芽分化率的影响来看,适当浓度的秋水仙碱对猕猴桃愈伤组织不定芽分化率有一定的促进作用,秋水仙碱在一定浓度和时间的组合处理下,愈伤组织不定芽分化率均有提高。这一现象也在白花除虫菊

同源四倍体诱导的试验<sup>[15]</sup>也有报道。

用秋水仙碱处理植物组织,不仅可以避免产生嵌合体的干扰现象,获得同质的多倍体;而且能反复多次试验,提高诱变率。秋水仙碱具有很大的毒性,高浓度的秋水仙碱不仅能使猕猴桃愈伤组织在培养中受害而生长缓慢,明显抑制不定芽分化,还会造成猕猴桃愈伤组织在培养中褐化死亡。因此,控制秋水仙碱的处理浓度和使用时间非常重要。

### 4 结论

秋水仙碱对猕猴桃愈伤组织不定芽分化率有很大的影响,阔叶猕猴桃愈伤组织在秋水仙碱0.05%浓度下处理24 h,其不定芽分化率达100%,而对照为58.33%。在0.50%秋水仙碱浓度下处理24 h,海沃德胚乳愈伤组织的不定芽分化率达到最大,为75%。金桃胚乳愈伤组织不定芽分化率达到最大时的秋水仙碱浓度为0.2%,处理时间为24 h。

秋水仙碱处理对猕猴桃再生芽数的影响因猕猴桃种类而异,海沃德再生芽数的最佳组合:0.20%的秋水仙碱处理24 h;阔叶猕猴桃再生芽数的最佳组合:0.05%的秋水仙碱处理24 h。

表 2 秋水仙碱处理对不同猕猴桃愈伤组织平均再生芽数的影响

Table 2 Effects of colchicines on number of shoot per explant of different callus of kiwifruit

组别 No.	处理时间 Time//h	处理浓度 Concentration//%	平均再生芽数 Number of shoot per explant		
			海沃德 CEH	金桃 CEJ	阔叶猕猴桃 CPAL
0	0	0.00	2.33±0.58 AB	2.50±0.71 A	3.71±1.50 AB
1	24	0.01	4.14±3.53 AB	2.50±0.71 A	3.75±1.75 AB
2	24	0.05	6.00±3.85 A	2.50±0.71 A	7.58±3.65 A
3	24	0.10	3.63±1.30 AB	2.67±0.58 A	2.83±3.60 B
4	24	0.20	6.29±3.20 A	3.89±1.83 A	2.50±1.29 B
5	24	0.50	5.00±2.45 AB	2.00±1.00 A	2.00±1.00 B
6	48	0.01	2.40±0.89 AB	2.33±0.58 A	2.17±0.75 B
7	48	0.05	3.75±0.96 AB	1.50±0.71 A	2.45±1.37 B
8	48	0.10	2.25±0.71 AB	1.57±0.53 A	1.33±0.52 B
9	48	0.20	4.38±1.69 AB	1.67±0.82 A	3.00±2.16 B
10	48	0.50	3.14±1.35 AB	1.33±0.58 A	1.50±0.71 B
11	72	0.01	4.00±2.20 AB	3.33±1.75 A	2.60±1.14 B
12	72	0.05	2.25±1.26 AB	3.67±1.53 A	2.25±1.26 B
13	72	0.10	3.40±1.34 AB	2.00±0.00 A	1.75±0.96 B
14	72	0.20	1.50±0.71 B	—	—
15	72	0.50	—	—	—
16	96	0.01	1.40±0.55 B	2.00±0.00 A	1.50±0.71 B
17	96	0.05	2.75±1.50 AB	1.50±0.71 A	2.00±1.73 B
18	96	0.10	3.00±1.41 AB	1.50±0.71 A	—
19	96	0.20	—	—	—
20	96	0.50	—	—	—

注:数据为转入分化培养基 45 d 后统计;同列不同大写字母表示不同处理在 0.01 水平上差异显著(邓肯式多重分析)

Note: Data were taken after 45 d culture; different capitals in the same column indicated significantly difference at 0.01 level (Duncan's multiple range test)

## 参考文献

- [1] 王敏琴, 鲍雪珍, 王晓红. 葡萄多倍体诱导的初步研究[J]. 山东农业科学, 2000(1): 19-20.
- [2] 张文倩, 郝慧, 肖伟, 等. 秋水仙素诱导厚皮甜瓜倍性研究[J]. 山东农业科学, 2010(8): 11-14.
- [3] 高莉敏, 宗红, 陈运起, 等. 不同分化培养基对秋水仙碱处理大葱愈伤组织的影响[J]. 山东农业科学, 2011(2): 27-29.
- [4] 谢晓玲, 邓自发. 秋水仙素对大蒜生长的影响及多倍体诱导效应分析[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(9): 4191-4194.
- [5] 王冬旭, 苏小玲, 张金凤. 秋水仙素诱导阔叶风铃草多倍体研究[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(17): 8874-8876.
- [6] 汪剑鸣. 秋水仙素诱导白萝卜试验研究初报[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(3): 985-987.
- [7] 王丽艳, 郭永霞, 荆瑞勇, 等. 秋水仙碱诱导甘草四倍体的研究[J]. 激光生物学报, 2012, 21(3): 233-237.
- [8] 顾宏辉, 楼健, 周伟军. 秋水仙碱在油菜小孢子培养中的应用研究进展[J]. 中国油料作物学报, 2003, 25(2): 103-106.
- [9] 徐靛. 二倍体猕猴桃资源的离体再生与多倍体诱导[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2017.
- [10] 商宏莉, 汪卫星, 向素琼, 等. 利用组织培养技术进行红千层多倍体诱导[J]. 西南农业大学学报, 2003, 25(5): 396-399.
- [11] 张兴翠, 周昌华, 殷家明, 等. 药用百合的多倍体诱导及快速繁殖[J]. 西南农业大学学报, 2003, 25(1): 14-17.
- [12] 王跃华. 川黄柏多倍体诱导研究[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(6): 448-451.
- [13] 李林光, 何平, 欧春青, 等. 金冠苹果成熟胚离体诱导四倍体的研究[J]. 园艺学报, 2007, 34(5): 1129-1134.
- [14] 李益, 郑思乡. 花椰菜多倍体诱导研究初报[J]. 云南农业大学学报, 2007, 22(6): 786-790.
- [15] 刘蓁, 高山林, 岳磊, 等. 白花除虫菊同源四倍体的诱导及鉴定[J]. 药物生物技术, 2006, 13(3): 178-181.
- [16] 王争, 王宏燕, 邵婧鑫. 多年种植 RRS 对根际土壤微生物数量及氮素转化的影响[J]. 东北农业大学学报, 2012, 43(2): 92-97.
- [17] 朱银玲. 转 EPSPS 基因抗除草剂大豆对土壤原核微生物群落生态影响的研究[D]. 南京: 南京大学, 2015.
- [18] 章秋艳, 李刚, 杨志国. 转基因大豆种植对根际土壤酶活性和养分的影响[J]. 中国油料作物学报, 2014, 36(3): 409-413.
- [19] 左娇, 郭运玲, 孔华, 等. 转基因大豆安全性评价的研究进展[J]. 热带作物学报, 2013, 34(7): 1402-1407.

(上接第 24 页)

- [61] 唐影, 李世东, 缪作清. 转基因作物对土壤微生物的影响[J]. 中国生物防治, 2007, 23(4): 383-390.
- [62] MEANS N E, KREMER R J, RAMSIER C. Effects of glyphosate and foliar amendments on activity of microorganisms in the soybean rhizosphere[J]. J Environ Sci Health B, 2007, 42(2): 125-132.
- [63] 杜伟, 黄启星, 左娇, 等. 南繁条件下转基因大豆对根际土壤可培养微生物的影响[J]. 热带作物学报, 2012, 33(3): 417-421.