

红肉猕猴桃再生体系的建立及DNA条形码鉴定

赵许朋, 王继玥, 赵晓朋, 李杰姍, 陈亚鹏, 刘燕*

贵阳学院, 贵阳550005

摘要: 以产于河南省栾川县的野生红肉猕猴桃(*Actinidia* sp.)叶片为外植体, 诱导产生愈伤组织, 并对其进行不定芽分化、不定芽增殖、无菌苗生根等方面的研究, 建立了该品种再生体系; 同时运用DNA条形码技术, 以ITS、matK、SQ1、ML为目标序列, 对其亲缘关系进行鉴定, 结果显示: 在MS+0.5 mg·L⁻¹ 6-苄氨基嘌呤(6-BA)+2.0 mg·L⁻¹ 2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-D)培养基中, 愈伤组织分化率达100%; 在MS+4 mg·L⁻¹ 6-BA+0.2 mg·L⁻¹ 萘乙酸(NAA)培养基中, 49 d后, 不定芽分化率达88.89%; 在MS+3.5 mg·L⁻¹ 6-BA+0.2 mg·L⁻¹ NAA+0.2 mg·L⁻¹ 赤霉素(GA₃)中, 不定芽增殖率达100%, 增殖系数为7.85; 在1/2MS+0.2 mg·L⁻¹ 吲哚丁酸(IBA)培养基中, 不定芽生根率达到92.59%, 且根系发达; 移栽到珍珠岩与田间土壤体积比为1:4的生根基质中, 14 d后移栽成活率达到94%; DNA条形码分析结果显示产于河南省栾川县的红肉猕猴桃属于猕猴桃属净果组片髓系的软枣猕猴桃(*A. arguta*)。

关键词: 红肉猕猴桃; 植株再生; 愈伤组织; DNA条形码

猕猴桃(*Actinidia* sp.)是20世纪人工驯化的四大野生果树之一, 享有“水果之王”的美誉(原玉林等2016)。我国猕猴桃资源丰富, 有“猕猴桃故乡”的称号(赵许朋等2013)。因其具有可观的经济效益和科研价值, 国内外研究者对其进行了全面的理论和应用研究(Bi等2019; Hill等2019)。优质猕猴桃种质资源不断被发掘和应用, 红肉猕猴桃即为我国科研工作者在猕猴桃种质资源研究中的重大发现。在已有的红肉猕猴桃报道中, 主要有‘红阳’(齐秀娟等2015)和‘红宝石星’(齐秀娟等2011)两个品种, 前者原产地为四川省苍溪县, 主要特征是果肉中心呈红色, 又称红心猕猴桃(*A. chinensis* var. *rufopulpa*) (李鹤等2019), 并非全红品种; 而后者原产地是河南省栾川县, 具有果皮与果肉均为红色的特点(齐秀娟等2011), 是真正意义上的全红品种。本文采用的红肉猕猴桃为全红品种, 采集于河南省栾川县, 该品种果皮与果肉均呈玫瑰红色, 口味酸甜带香, 一经问世, 就得到果农和消费者的青睐, 其种植面积不断增加, 具有十分广阔的市场前景。然而, 受传统育苗技术的限制, 现有的苗木不能满足该品种的栽培需求, 使该品种不能得到快速的推广。植物组织培养技术具有克服有性繁殖造成的品种退化和实现苗木大量繁殖的特点(Sablok等2017; Yan等2018); 高效稳定的再生体系还是植物基因工程育种的基础(毕静华等2005; Abdin等2017), 如周月等(2014)在高效‘红阳’猕猴

桃再生体系基础上进行了猕猴桃抗病基因的遗传转化研究, 成功将抗病基因导入‘红阳’猕猴桃。已有研究者对红肉猕猴桃品种‘红阳’进行了组培再生体系的研究(严姜黎等2008), 然而其再生率较低, 也无试管苗增殖研究。因此, 利用组织培养技术建立产于河南省栾川县的红肉猕猴桃再生体系, 实现优良苗木的推广及优良基因的遗传转化就显得十分迫切。

红肉猕猴桃是一种十分珍贵的猕猴桃资源, 研究者从形态学上将产于河南省栾川县的红肉猕猴桃划归为软枣猕猴桃(*A. arguta*) (刘颖等2012), 然而, 未有关于其分子生物学亲缘关系鉴定的报道, 其分子生物学分类及归属尚不明确, 因此, 利用分子生物学技术对该品种进行亲缘关系鉴定就显得十分必要。DNA条形码(DNA barcoding)技术是一种利用一段标准DNA片段对物种进行分子生物学鉴定的方法(Wang等2016), 受到世界各国研究者的关注(Hebert和Gregory 2005; Chen等2010; Gao等2010), 该方法已广泛应用于猕猴桃等植物

收稿 2019-08-16 修定 2020-02-18

资助 贵州省教育厅重点项目(黔教合KY字[2015]382号)、贵州省科技厅联合基金项目(黔科合LH字[2015]7310号)、贵州省一流大学建设项目-一流师资队伍-生物学教学团队(2017158322)和贵阳市科技局-贵阳学院科技专项资金项目(GYU-KYZ[2019~2020]PT13-01)。

* 通讯作者(gly68@sina.com)。

亲缘关系的鉴定(Gao等2010; Liu等2014), 这为产于河南省栾川县的红肉猕猴桃条形码分析提供了理论支持。

本研究拟开展红肉猕猴桃组织培养及DNA条形码亲缘关系的研究, 以产于河南省栾川县的野生红肉猕猴桃叶片为材料, 建立其再生体系, 并用DNA条形码技术对其亲缘关系进行鉴定, 为实现其大量繁殖从而解决苗木供应与栽培推广之间的矛盾提供依据, 也为其亲缘关系的鉴定及分类地位的确立提供分子生物学依据, 并为其遗传转化导入和表达外源基因提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验材料为野生品种红肉猕猴桃(*Actinidia Lindl. sp.*), 采集于河南省栾川县, 取其幼嫩叶片为外植体进行组织培养研究。

1.2 实验方法

1.2.1 外植体消毒

取红肉猕猴桃幼嫩叶片, 用蓝月亮洗衣液清洗, 然后用体积分数为75%的乙醇和 $1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ HgCl_2 消毒, 时间分别为40 s和9 min, 再用无菌蒸馏水冲洗3~5次, 修剪为 1 cm^2 大小叶盘备用。

1.2.2 愈伤组织诱导

将第1.2.1节所述叶盘接种至不同配比愈伤组织诱导培养基上, 暗培养28 d, 统计愈伤组织诱导率。

1.2.3 不定芽分化培养

选取生长旺盛且质地致密的愈伤组织接种至不定芽分化培养基上, 暗培养7 d, 然后转入光照下培养49 d, 期间观察并统计不定芽分化率、平均芽数等; 平均芽数=总芽数/出芽愈伤组织数。

1.2.4 不定芽增殖培养

选取长度为0.8 cm左右的再生芽, 转移至芽增殖培养基, 49 d后统计增殖率; 增殖率=增殖后芽数/接种芽数(赵许朋等2013)。

1.2.5 芽生根培养及移栽

选取长2~3 cm的不定芽, 接种至含有不同浓度吲哚丁酸(IBA)的1/2MS (大量元素减半)固体培养基中, 28 d后统计生根率、平均根数(根总数/接种芽数) (赵许朋等2013)。炼苗移栽方法: 在室温

下控制空气湿度在90%以上, 将培养瓶瓶盖拧松放置2 d, 敞口1/3放置2 d, 敞口1/2放置2 d, 完全敞口放置1 d, 再将组培苗取出, 清洗培养基, 移栽, 其基质为珍珠岩和田间土壤(体积比1:4), 适量浇水, 14 d后统计成活率。

1.2.6 DNA条形码分析

(1)基因组提取: 采用十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)法提取红肉猕猴桃基因组。

(2)条形码序列选择: 选用植物条形码通用序列ITS (核基因核糖体转录间隔区序列)、matK (tRNA成熟酶编码基因序列) (蔡洪月等2017)以及猕猴桃条形码专用序列SQ1 (猕猴桃叶绿体基因组rps16-trnQ序列)、ML (猕猴桃叶绿体基因组ndhF-rpl32序列) (Liu等2014), 对红肉猕猴桃亲缘关系进行鉴定。

(3)目的序列扩增及测序: 按照第1.2.6节第(1)部分所述方法提取猕猴桃DNA, 并以其为模板, 以ITS、matK、SQ1和ML保守序列为引物[表1, matK序列引物根据中华猕猴桃(*A. chinensis* Planch.) matK保守序列设计]进行PCR扩增。反应体系: *Premix Taq* 12.5 μL 、Primer-F和Primer-R ($10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 各0.5 μL 、DNA template 2 μL 、双蒸水(ddH_2O) 11.5 μL 。反应程序: 94°C 预变性3 min; 94°C 变性30 s, 55°C 退火45 s, 72°C 延伸45s, 32个循环; 72°C 延伸10 min。PCR产物用 $10\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 琼脂糖凝胶电泳检测, 切胶回收目的条带, 送北京诺赛基因公司进行测序。

目的条带聚类分析: 用Chromas 2.4对测序结果进行分析并删除低质量信号区, 然后用NCBI中Blast工具进行序列比对, 选取猕猴桃属物种用于亲缘关系鉴定; 目的序列与同属物种序列比对采用Clustal X 2.0和MEGA 7.01 (Thompson等1997); 采用K2P模型进行遗传距离分析, 构建NJ (neighbor-joining)树[遗传距离采用K2P模型, bootstrap (自展值)设置为1 000] (Tamura等2011)。

猕猴桃再生体系的建立过程在无菌条件下进行, 基本培养基为MS或1/2MS (含琼脂 $8\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、蔗糖 $30\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), 温度(25 ± 2) $^\circ\text{C}$, 光照 $4\text{ }500\text{ mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ($16\text{ h}\cdot\text{d}^{-1}$), pH 5.85。愈伤组织诱导培养基见表2, 不定芽分化培养基见表3, 不定芽增殖培养基见表4,

表1 本文涉及到的引物
Table 1 The primer sequences in this article

条形码名称	长度/bp	引物名称	引物序列(5'→3')
ITS (Wang等2016)	700	ITS-F	GGAAGTAAAAAGTCGTAACAAGG
		ITS-R	TCCTCCTCCGCTTATTGATATGC
matK	1 139	matK-F	CCAAATACCAAATCCGCCCTCT
		matK-R	CCTAGAAGGGAAAGAAACAGTCA
ML (Liu等2014)	905	ML-F	ACAGGAAGTGGAAAGTGGAAACAA
		ML-R	AAAGCTTTTAAGGCTGCCCAA
SQ1 (Liu等2014)	969	SQ1-F	AACGATTTCGATAGACGGCTCA
		SQ1-R	ATTCCATACCGGCTACAAAGC

表2 植物生长调节剂对红肉猕猴桃愈伤组织诱导的影响
Table 2 Effects of plant growth regulators on callus induction of red-fleshed kiwifruit leaves

编号	2,4-D浓度/mg·L ⁻¹	6-BA浓度/mg·L ⁻¹	接种外植体数	脱分化外植体数	愈伤组织诱导率/%	生长状况
A ₁	1	0.25	18	15.33±0.88 ^b	85.19±4.90 ^b	白色, 水浸状
A ₂	2	0.25	18	17.67±0.33 ^a	98.15±1.85 ^a	白色, 湿润致密
A ₃	3	0.25	18	15.33±0.67 ^b	85.19±3.70 ^b	黄白色, 疏松
A ₄	1	0.50	18	14.00±0.58 ^b	77.78±3.21 ^b	白色, 疏松, 水浸状
A ₅	2	0.50	18	18 ^a	100 ^a	白色微黄, 湿润致密
A ₆	3	0.50	18	14.67±0.88 ^b	81.48±4.90 ^b	白色, 疏松, 水浸状

同列数据用不同字母标识表示差异显著(P<0.05), 下同。

表3 植物生长调节剂对红肉猕猴桃不定芽诱导的影响
Table 3 Effects of plant growth regulators on induction of adventitious bud from red-fleshed kiwifruit calli

编号	6-BA浓度/mg·L ⁻¹	NAA浓度/mg·L ⁻¹	愈伤接种数	出芽愈伤数	出芽率/%	平均芽数	生长状况
B ₁	3.0	0.2	18	5.67±0.88 ^c	31.48±4.90 ^c	1.95±0.55 ^b	茎叶分化明显
B ₂	4.0	0.2	18	16.00±1.00 ^a	88.89±5.56 ^a	6.78±0.79 ^a	茎叶分化明显
B ₃	5.0	0.2	18	10.00±1.15 ^b	55.56±6.42 ^b	3.66±0.53 ^b	有畸形苗
B ₄	3.0	0.4	18	6.67±0.33 ^c	37.04±1.85 ^c	2.70±0.75 ^b	茎叶分化明显
B ₅	4.0	0.4	18	14.67±0.88 ^a	81.48±4.90 ^a	6.36±0.46 ^a	茎叶分化明显
B ₆	5.0	0.4	18	2.67±1.20 ^d	14.81±6.68 ^d	2.97±1.24 ^b	有畸形苗

表4 植物生长调节剂对红肉猕猴桃不定芽增殖的影响
Table 4 Effects of plant growth regulators on multiplication of red-fleshed kiwifruit adventitious buds

编号	6-BA浓度/mg·L ⁻¹	NAA浓度/mg·L ⁻¹	GA ₃ 浓度/mg·L ⁻¹	外植体数	增殖率/%	增殖倍数	平均芽长/cm
C ₁	2.5	0.2	0.2	18	62.96±6.68 ^b	2.85±0.30 ^b	4.98±0.32 ^{ab}
C ₂	3.5	0.2	0.2	18	100 ^a	7.85±1.28 ^a	3.79±0.26 ^c
C ₃	4.5	0.2	0.2	18	98.15±1.85 ^a	5.31±1.44 ^{ab}	5.15±0.14 ^a
C ₄	2.5	0.4	0.2	18	42.59±6.68 ^c	3.60±0.71 ^b	5.01±0.32 ^{ab}
C ₅	3.5	0.4	0.2	18	92.59±4.90 ^a	6.90±0.88 ^a	4.18±0.13 ^{bc}
C ₆	4.5	0.4	0.2	18	100 ^a	3.80±0.54 ^b	4.88±0.33 ^{ab}

表5 IBA浓度对红肉猕猴桃不定芽生根的影响
Table 5 Effects of IBA concentration on rooting of red-fleshed kiwifruit adventitious buds

编号	IBA浓度/mg·L ⁻¹	接种不定芽数	生根率/%	平均根数	生长状况
D ₁	0	18	50.00±6.42 ^b	2.15±0.57 ^c	无侧根增殖
D ₂	0.1	18	87.04±1.85 ^a	3.67±0.53 ^b	侧根增殖较明显
D ₃	0.2	18	92.59±3.70 ^a	6.13±0.39 ^a	侧根增殖较明显
D ₄	0.3	18	85.19±4.90 ^a	4.20±0.36 ^b	侧根增殖明显
D ₅	0.4	18	77.78±6.42 ^a	2.91±0.16 ^{bc}	侧根增殖不明显
D ₆	0.5	18	50.00±9.62 ^b	1.82±0.32 ^c	无侧根增殖

生根培养基见表5。以上每种处理均为3次重复,每次重复接种18个材料。愈伤组织诱导阶段和不定芽诱导前7 d为暗培养,其余阶段为光照培养。

2 实验结果

2.1 红肉猕猴桃再生体系的建立

2.1.1 植物生长调节剂对叶片愈伤组织分化的影响

叶片外植体接种后, 7~14 d为萌动期, 具体表现是, 切口部位膨胀分化出愈伤组织, 叶脉处分化较明显(图1-A), 28 d后萌发率达到最高且稳定, 愈伤组织呈白色透明略有微黄状, 可能是由于光照

条件(暗培养)抑制了叶绿素的合成。统计结果显示(表2), A₅愈伤组织分化率最高, 达100%, 然而与A₂无显著差异; A₄愈伤组织分化率最低, 为77.78%, 然而与A₁、A₃、A₆无显著差异。A₂与A₅相比, A₅诱导愈伤组织生长良好, 呈白色湿润致密微黄状, 有利于后期不定芽分化。因此, 在本研究中, 红肉猕猴桃叶片愈伤组织分化最佳培养基为MS+2.0 mg·L⁻¹ 2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-D)+0.5 mg·L⁻¹ 6-苄氨基嘌呤(6-BA)。

2.1.2 植物生长调节剂对叶片不定芽分化的影响
在光照条件下, 培养14 d后(图1-B), 愈伤组织

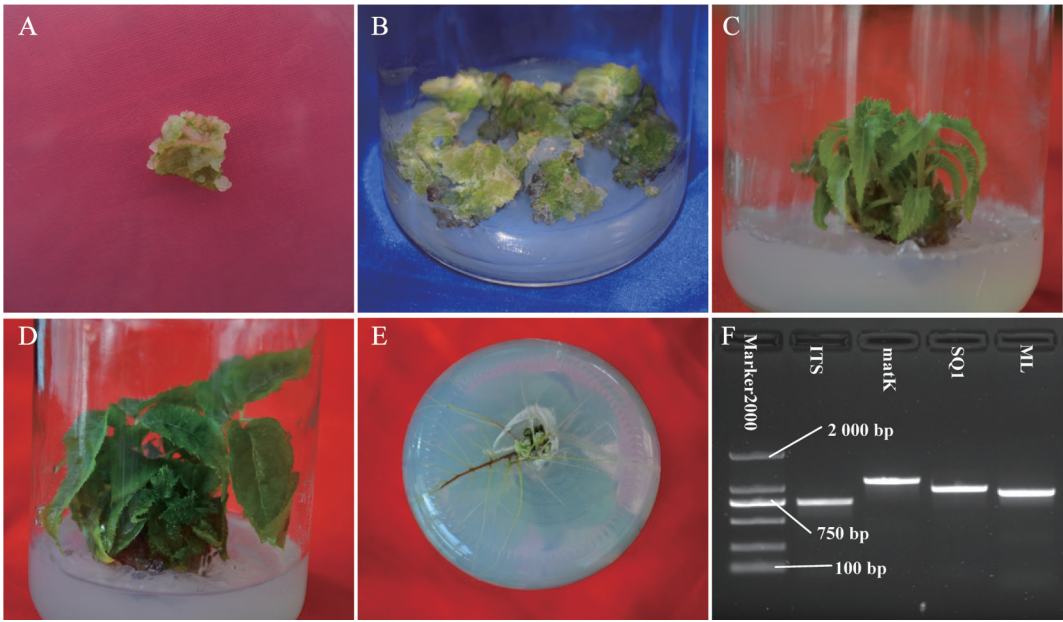


图1 红肉猕猴桃叶片再生体系及目标序列电泳结果

Fig.1 Establishment of regeneration system from red-fleshed kiwifruit leaves and the results of agarose gel electrophoresis of the targeted sequence

A: 叶片萌动形成愈伤组织; B: 继代培养中生长良好的愈伤组织; C: 不定芽分化; D: 不定芽增殖; E: 不定芽生根; F: 目标序列扩增结果。

合成叶绿素, 逐渐变为绿色; 35 d后, 愈伤组织有红色颗粒点出现, 且在红色颗粒点处出现不定芽分化, 其中B₂、B₅中最先分化出不定芽; 49 d后, 各个培养基中不定芽分化率达到最高。统计分析显示(表3), B₂诱导率最高, 达88.89%, 略高于B₅的诱导率81.48%, 且与B₁、B₃、B₄、B₆差异显著; 除B₃、B₆外, 其余培养基分化不定芽的茎、叶分化明显, 且长势良好(图1-C); B₂平均芽数最多, 为6.78个, 略高于B₅的6.36个, 且与B₁、B₃、B₄、B₆差异显著。在B₃、B₆中, 可能是由于较高的细胞分裂素使分化的不定芽节间极度缩短, 甚至仅有单片叶分化的畸形苗。因此, 在本研究中, 红肉猕猴桃愈伤组织分化不定芽最佳培养基为MS+4.0 mg·L⁻¹ 6-BA+0.2 mg·L⁻¹ 萘乙酸(NAA)。

2.1.3 植物生长调节剂对不定芽增殖的影响

不定芽接种14 d后, 腋芽开始萌动; 28 d左右, 有新生芽出现; 继续培养, 出现簇生芽(图1-D); 49 d后统计结果(表4), 发现C₂和C₆增殖率最高, 达到100%, 然而与C₃和C₅无显著差异, 说明红肉猕猴桃较容易实现不定芽增殖, 且增殖率较高; 比较分析增殖系数显示(表4), C₂最高, 为7.85, 略高于C₅增殖倍数6.9, 且与C₁、C₃、C₄、C₆差异显著; 虽然C₂和C₆增殖率和增殖倍数较高, 但是平均芽长较短, 分别为3.79和4.18 cm, 可能是由于培养后期新增殖芽发育时间较短, 影响了整个芽长的平均值。综上分析, 红肉猕猴桃不定芽增殖的最佳培养基为MS+3.5 mg·L⁻¹ 6-BA+0.2 mg·L⁻¹ NAA+0.2 mg·L⁻¹ 赤霉素(GA₃)。

2.1.4 试管苗生根与移栽

不定芽接种5~15 d后, 开始出现根点分化并发育出不定根; 28 d后统计分析显示(表5), D₃生根率最高, 达到92.59%, 与D₁、D₆有显著差异; D₃平均根数最多(图1-E), 达到6.13个, 与D₁、D₂、D₄、D₅、D₆有显著差异; 试验结果还显示适宜浓度的IBA (0.1~0.2 mg·L⁻¹)有利于不定根增殖产生侧根(图1-E), 而不添加IBA (0 mg·L⁻¹)和添加较高浓度IBA (0.3~0.5 mg·L⁻¹)可能会降低或抑制不定根侧根增殖。综上分析, 红肉猕猴桃不定芽生根的最佳培养基为1/2MS+0.2 mg·L⁻¹ IBA。

选取长势一致的50株试管苗进行炼苗并移栽

至珍珠岩混和田间土壤基质中, 14 d后成活47株, 成活率达94%, 且生长良好。

2.2 红肉猕猴桃DNA条形码亲缘关系鉴定

2.2.1 目的条带扩增及质量分析

以红肉猕猴桃基因组为模板, 以ITS、matK、SQ1和ML片段保守序列为引物进行PCR扩增, 扩增成功率达到100%, 且条带与目标长度一致(图1-F), 测序结果显示成功率达到100%; Chromas 2.4软件分析结果显示, 测序质量较高, 可用于后续条形码分析。

2.2.2 目标序列系统进化树分析

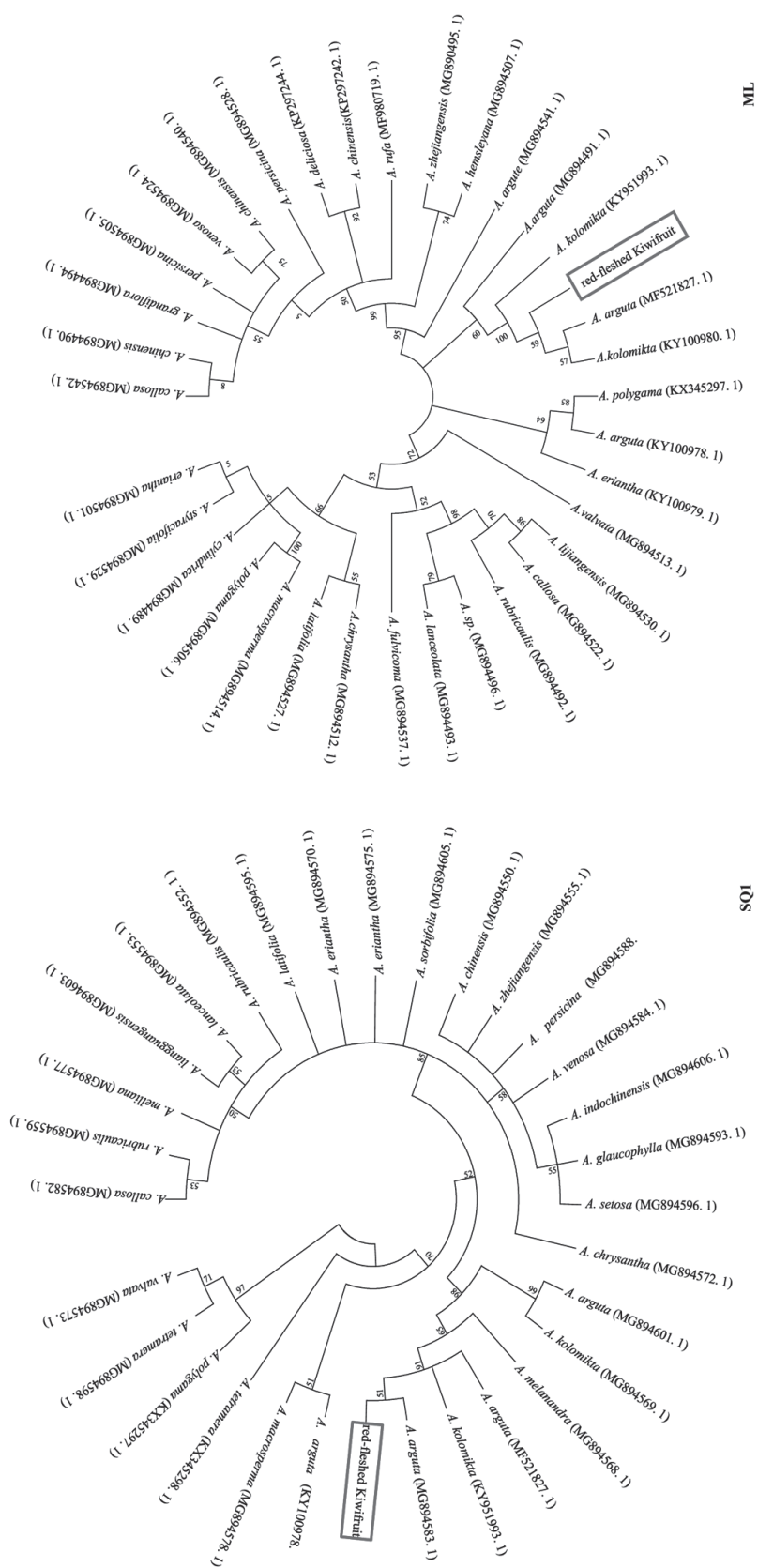
基于ITS、matK、SQ1和ML序列分别建立系统进化树(图2), 表明: ITS系统进化树主要聚为两支, 其中红肉猕猴桃与软枣猕猴桃、山梨猕猴桃(*A. rufa*)、黑蕊猕猴桃(*A. melanandra*)等聚为一支; 在该分支中, 红肉猕猴桃与软枣猕猴桃又聚为一支, 因此从ITS条形码结果可知, 红肉猕猴桃与软枣猕猴桃亲缘关系最近。matK系统进化树主要聚为两支, 其中红肉猕猴桃与软枣猕猴桃、中华猕猴桃(*A. chinensis*)、山梨猕猴桃等聚为一支; 在该分支中, 红肉猕猴桃与山梨猕猴桃又聚为一支, 因此从matK条形码结果可知, 红肉猕猴桃与山梨猕猴桃亲缘关系最近。SQ1系统进化树主要聚为两支, 其中红肉猕猴桃、山梨猕猴桃、软枣猕猴桃和黑蕊猕猴桃聚为一支; 在该分支中, 红肉猕猴桃与软枣猕猴桃又聚为一支, 因此从SQ1条形码结果可知, 红肉猕猴桃与软枣猕猴桃亲缘关系最近。ML系统进化树主要聚为两支, 其中红肉猕猴桃与狗枣猕猴桃(*A. kolomikta*)、中华猕猴桃等聚为一支, 在该分支中, 红肉猕猴桃、狗枣猕猴桃与软枣猕猴桃又聚为一支, 因此从ML条形码结果可知, 红肉猕猴桃与狗枣猕猴桃或软枣猕猴桃亲缘关系最近。综上分析, 与红肉猕猴桃亲缘关系最近的为山梨猕猴桃、狗枣猕猴桃或软枣猕猴桃。

2.2.3 目标序列遗传距离分析

采用K2P模型基于ITS、matK、SQ1和ML序列对红肉猕猴桃进行遗传距离分析: ITS序列聚类分析结果显示红肉猕猴桃与其他猕猴桃品种之间遗传距离最大值和最小值分别是0.114和0.004, 对应品种为大籽猕猴桃(*A. macrosperma*)和软枣猕猴桃



图2 基于ITS、matK、SQ1、ML序列构建猕猴桃系统进化树



桃, 由此可知, 红肉猕猴桃与软枣猕猴桃亲缘关系最近; matK序列聚类分析结果显示红肉猕猴桃与其他猕猴桃品种之间遗传距离最大值和最小值分别是1.020和0.001, 对应品种为对萼猕猴桃(*A. valvata*)和狗枣猕猴桃, 由此可知, 红肉猕猴桃与狗枣猕猴桃亲缘关系最近; SQ1序列聚类分析结果显示红肉猕猴桃与其他猕猴桃品种之间遗传距离最大值和最小值分别是0.015和0, 最大值对应品种为四萼猕猴桃(*A. tetramera*), 最小值对应品种为软枣猕猴桃、狗枣猕猴桃、黑蕊猕猴桃, 由此可知, 红肉猕猴桃与软枣猕猴桃、狗枣猕猴桃、黑蕊猕猴桃亲缘关系最近; ML序列聚类分析结果显示红肉猕猴桃与其他猕猴桃品种之间遗传距离最大值和最小值分别是0.092和0.002, 对应品种为葛枣猕猴桃(*A. polygama*)和软枣猕猴桃, 由此可知, 红肉猕猴桃与软枣猕猴桃亲缘关系最近。综上分析, 与红肉猕猴桃亲缘关系最近的为山梨猕猴桃、狗枣猕猴桃、软枣猕猴桃、黑蕊猕猴桃。

3 讨论

猕猴桃是果树研究中的一个热点植物, 具有十分重要的研究和应用价值。红肉猕猴桃是我国科研工作者在猕猴桃种质资源研究中的重大发现, 然而, 产于河南省栾川县的红肉猕猴桃大面积推广及分子生物学种类归属问题尚待解决, 因此, 本实验开展了红肉猕猴桃组织培养及基于DNA条形码技术鉴定其亲缘关系的研究。

在本研究中, 叶片外植体在MS+0.5 mg·L⁻¹ 6-BA+2.0 mg·L⁻¹ 2,4-D培养基中愈伤组织诱导率达100%, 愈伤组织生长良好(表2和图1-B), 与Kim等(2007)的研究结果一致。不定芽分化是植物组织培养的核心内容, 许多植物由于不定芽分化困难而限制了其组织培养的研究进度。在猕猴桃组织培养分化不定芽阶段, 研究者常将玉米素(ZT)与NAA或6-BA与NAA配比进行不定芽的诱导, 且ZT效果要优于6-BA (Oliveira和Pais 1991), 但是ZT价格昂贵, 必然会增加研究和应用成本。本研究将6-BA与NAA (B₂培养基)组合诱导不定芽, 诱导率达88.89%, 平均芽数达6.78, 略高于Prado等(2007)的不定芽诱导率(80%)。高效的不定芽增殖技术是

获得大量试管苗的基础, 也是研究者关注的一个热点, Sotiropoulos等(2004)在美味猕猴桃(*A. chinensis* var. *deliciosa*)组织培养中的增殖系数为4.8, 隆前进等(2010)在‘红阳’猕猴桃组织培养中的增殖系数为5.2; 本研究采用6-BA与NAA组合并添加0.2 mg·L⁻¹ GA₃获得了较佳的增殖率, 增殖系数达到7.85, 且不定芽生长旺盛(图1-D), 略高于Sotiropoulos等(2004)的研究结果。根系的诱导是建立完整植株再生体系不可缺少的环节, 且根系的数量和质量直接决定了试管苗的移栽成活率。在本研究中, 不定芽在添加0.2 mg·L⁻¹ IBA的1/2MS固体培养基中生根率最高, 根系的数量和长度均较大; 将试管苗移栽至第1.2.5节所述基质中, 移栽成活率达到94%。综上所述, 本研究建立的红肉猕猴桃再生体系, 具有愈伤组织诱导率高、不定芽分化率高且平均芽数多、不定芽增殖率高、试管苗根系发达、移栽成活率高的优势, 且用6-BA代替玉米素进行不定芽分化和不定芽增殖降低了组织培养成本。

红肉猕猴桃是一种十分珍贵的猕猴桃资源, 用分子生物学技术对其亲缘关系进行鉴定并确立其种间分类地位具有十分重要的意义。本研究选用植物条形码通用序列ITS、matK, 以及猕猴桃条形码专用序列SQ1、ML对红肉猕猴桃亲缘关系进行鉴定, 研究结果显示, 以ITS为目标序列, 系统进化树和遗传距离均表明红肉猕猴桃与软枣猕猴桃亲缘关系最近; 以matK为目标序列, 系统进化树和遗传距离均表明红肉猕猴桃与狗枣猕猴桃亲缘关系最近; 以SQ1为目标序列, 系统进化树结果表明红肉猕猴桃与软枣猕猴桃亲缘关系最近, 而红肉猕猴桃与软枣猕猴桃、狗枣猕猴桃和黑蕊猕猴桃遗传距离结果均为0, 因此, 综合分析, 以SQ1为目标序列, 红肉猕猴桃与软枣猕猴桃亲缘关系最近; 以ML为目标序列, 系统进化树结果表明红肉猕猴桃与狗枣猕猴桃或软枣猕猴桃亲缘关系最近, 遗传距离结果表明红肉猕猴桃与软枣猕猴桃亲缘关系最近, 综合分析, 以SQ1为目标序列, 红肉猕猴桃与软枣猕猴桃亲缘关系最近。综合以上结果, 可知通过ITS、SQ1、ML条形码分析出红肉猕猴桃与软枣猕猴桃亲缘关系最近, 而通过matK条形码分析出红肉猕猴桃与狗枣猕猴桃亲缘关系最近。然而,

matK是植物通用条形码, 非猕猴桃专有, 该基因序列进化速度较快(Selvaraj等2008), 差异较大, 虽然可以提供更多的识别, 但是常常与其他条形码组合进行亲缘关系鉴定(陈芙蓉等2019); 并且狗枣猕猴桃、软枣猕猴桃同属于猕猴桃属净果组片髓系(中国科学院中国植物志编辑委员会1984), 亲缘关系较近, 也增加了用matK序列鉴定其亲缘关系的难度。因此, 本研究选用植物条形码通用序列ITS、matK, 以及猕猴桃条形码专用序列SQ1、ML组合的方式对红肉猕猴桃亲缘关系进行鉴定, 将红肉猕猴桃归入猕猴桃属净果组片髓系软枣猕猴桃, 该结果也与前人依据形态学特征进行的分类一致(刘颖等2012)。

本研究以产于河南省栾川县的红肉猕猴桃叶片为外植体, 以2,4-D、6-BA、NAA和GA₃等为生长调节剂, 完成了该品种再生体系的建立, 为其试管苗的工厂化生产及基因工程育种提供参考; 同时, 以ITS、matK、SQ1、ML为条形码分析出该品种属于猕猴桃属净果组片髓系软枣猕猴桃, 为从分子生物学角度确立其分类地位提供依据。

参考文献(References)

- Abdin MZ, Kiran U, Kamaluddin, et al (2017). Plant Biotechnology: Principles and Applications. Berlin: Springer, 37–72
- Bi JH, Liu YL, Asghar S (2005). *In vitro* organogenesis and plant regeneration from leaf explants of *Actinidia latifolia*. J Fruit Sci, 22 (4): 405–408 (in English with Chinese abstract) [毕静华, 刘永立, Asghar S (2017). 阔叶猕猴桃叶片离体器官发生和植株再生. 果树学报, 22 (4): 405–408]
- Bi X, Hieno A, Otsubo K, et al (2019). A multiplex PCR assay for three pathogenic *Phytophthora* species related to kiwifruit diseases in China. J Gen Plant Pathol, 85 (1): 12–22
- Cai HY, Xing ST, He RR, et al (2017). Phylogenetic relationship analysis of genus *Rhododendron* (Ericaceae) from Mountain Tai based on ITS2 sequences and morphological traits. Plant Physiol J, 53 (8): 1489–1498 (in Chinese with English abstract) [蔡洪月, 邢树堂, 何蓉蓉等(2017). 基于ITS2序列和形态学特征对泰山杜鹃属植物系统发育关系的分析. 植物生理学报, 53 (8): 1489–1498]
- CAS Editorial Committee of the Flora of China (1984). Flora of China. 49 (2). Beijing: Science Press, 205–206 (in Chinese) [中国科学院中国植物志编辑委员会(1984). 中国植物志. 49 (2). 北京: 科学出版社, 205–206]
- Chen FR, Wang T, Guo QS, et al (2019). Identification of *Chrysanthemum indicum* in different geographical populations and *Ch. morifolium* based on DNA barcodes of *psbA-trnH*, *matK* and *trnL*. Chin J Chin Mater Med, 44 (4): 38–43 (in Chinese with English abstract) [陈芙蓉, 汪涛, 郭巧生等(2019). 基于DNA条形码*psbA-trnH*, *matK*, *trnL*对不同地理居群野菊和药用菊的鉴定研究. 中国中药杂志, 44 (4): 38–43]
- Chen S, Yao H, Han J, et al (2010). Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species. PLoS ONE, 5 (1): e8613
- Gao T, Yao H, Song J, et al (2010). Identification of medicinal plants in the family Fabaceae using a potential DNA barcode ITS2. J Ethnopharmacol, 130 (1): 116–121
- Hebert PD, Gregory TR (2005). The promise of DNA barcoding for taxonomy. Syst Biol, 54 (5): 852–859
- Hill MG, Zhuang QG, Mauchline NA, et al (2019). Testing the susceptibility of kiwifruit (*Actinidia chinensis* var. *deliciosa*) germplasm to *Hemiberlesia lataniae*. New Zeal J Crop Hort, 47 (1): 1–10
- Kim M, Kim SC, Moon DY, et al (2007). Rapid shoot propagation from micro-cross sections of kiwifruit (*Actinidia deliciosa* cv. 'Hayward'). J Plant Biol, 50 (6): 681–686
- Li H, Yang H, Cao D, et al (2019). Effect of pretreatment methods on the fermentation quality and aroma components of red kiwifruit wines. Sci Tech Food Ind, 40 (2): 100–106 (in Chinese with English abstract) [李鹤, 杨华, 曹东等(2019). 前处理方式对红心猕猴桃酒发酵品质和香气成分的影响. 食品工业科技, 40 (2): 100–106]
- Liu H, Liu X, Liu Q, et al (2014). Study on genetic diversity of 7 populations of *Actinidia* by using chloroplast genome fragment. Bot Res, (3): 238–248
- Liu Y, Zhao CZ, Wu FK, et al (2012). Identification and extraction of anthocyanins in red-fleshed kiwifruit. J Fruit Sci, 29 (3): 493–497 (in Chinese with English abstract) [刘颖, 赵长竹, 吴丰魁等(2012). 红肉猕猴桃花色苷组成及浸提研究. 果树学报, 29 (3): 493–497]
- Long QJ, Wu YJ, Xie M (2010). Tissue culture and rapid micro-propagation from leaves and stems of kiwifruit (*Actinidia deliciosa* cv. 'Hongyang'). Acta Agr Zhejiangensis, 22 (4): 429–432 (in Chinese with English abstract) [隆前进, 吴延军, 谢鸣(2010). '红阳'猕猴桃叶片和带芽茎段的组织培养快繁技术. 浙江农业学报, 22 (4): 429–432]
- Oliveira MM, Pais MS (1991). Plant regeneration from protoplasts of long-term callus cultures of *Actinidia deliciosa* var. *deliciosa* cv. Hayward (kiwifruit). Plant Cell Rep, 9 (11): 643–646
- Prado MJ, Gonzalez MV, Romo S, et al (2007). Adventitious plant regeneration on leaf explants from adult male kiwi-

- fruit and AFLP analysis of genetic variation. *Plant Cell Tiss Org*, 88 (1): 1–10
- Qi XJ, Han LX, Li M, et al (2011). A new all-red kiwifruit cultivar ‘Rubystar’. *Acta Horti Sin*, 38 (3): 601–602 (in Chinese with English abstract) [齐秀娟, 韩礼星, 李明等 (2011). 全红型猕猴桃新品种‘红宝石星’. *园艺学报*, 38 (3): 601–602]
- Qi XJ, Xu SK, Lin MM, et al (2015). Research advances on fruit coloring mechanism in red-fleshed kiwifruit. *J Fruit Sci*, 32 (6): 1232–1240 (in Chinese with English abstract) [齐秀娟, 徐善坤, 林苗苗等 (2015). 红肉猕猴桃果实着色机制研究进展. *果树学报*, 32 (6): 1232–1240]
- Sablok G, Budak H, Ralph P (2017). *Brachypodium Genomics: Methods and Protocols*. New Jersey: Humana Press, 289–310
- Selvaraj D, Sarma RK, Sathishkumar R (2008). Phylogenetic analysis of chloroplast *matK* gene from Zingiberaceae for plant DNA barcoding. *Bioinformation*, 3 (1): 24–27
- Sotiropoulos TE, Dimassi KN (2004). Response to increasing rates of boron and NaCl on shoot proliferation and chemical composition of *in vitro* kiwifruit shoot cultures. *Plant Cell Tiss Org*, 79 (3): 285–289
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, et al (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol*, 28 (10): 2731–2739
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, et al (1997). The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res*, 25 (24): 4876–4882
- Wang XY, Zheng SH, Liu Y, et al (2016). ITS2, a better DNA barcode than ITS in identification of species in *Artemisia* L. *Chin Herb Med*, 8 (4): 352–358
- Yan JL, Zhang Y, Xing M, et al (2008). Studies on rapid micro-propagation technique of *Actinidia chinensis* var. *rufopulpa*. *J Huazhong Agr Univ*, 27 (1): 101–104 (in Chinese with English abstract) [严姜黎, 张翼, 邢梅等 (2008). 红肉猕猴桃离体快速繁殖技术研究. *华中农业大学学报*, 27 (1): 101–104]
- Yan Q, Karau MJ, Greenwood-Quaintance KE, et al (2018). Comparison of diagnostic accuracy of periprosthetic tissue culture in blood culture bottles to that of prosthesis sonication fluid culture for diagnosis of prosthetic joint infection (PJI) by use of Bayesian latent class modeling and IDSA PJI criteria for classification. *J Clin Microbiol*, 56 (6): JCM.00319-18
- Yuan YL, Tong XL, Hou CM, et al (2016). Difference of ascorbic acid synthesis and metabolism in different genotypes of kiwifruit. *Plant Physiol J*, 52 (12): 1877–1883 (in Chinese with English abstract) [原玉林, 同晓蕾, 侯长明等 (2016). 不同基因型猕猴桃果实中抗坏血酸合成与代谢的差异. *植物生理学报*, 52 (12): 1877–1883]
- Zhao XP, Zhou Y, Yang L, et al (2013). Establishment of a highly efficient regeneration system from stem segments of ‘Red Sun’ kiwifruit (*Actinidia chinensis*). *J Southwest Univ Nat Sci Ed*, 35 (2): 6–10 (in Chinese with English abstract) [赵许朋, 周月, 杨立等 (2013). ‘红阳’猕猴桃茎段高效再生体系的建立. *西南大学学报(自然科学版)*, 35 (2): 6–10]
- Zhou Y, Zhao XP, Wu XH, et al (2014). *Agrobacterium*-mediated transformation of *LJAMP2* gene into ‘Red Sun’ kiwifruit and its molecular identification. *Chin J Biotechnol*, 30 (6): 931–942 (in Chinese with English abstract) [周月, 赵许朋, 吴秀华等 (2014). 农杆菌介导 *LJAMP2* 基因导入‘红阳’猕猴桃及分子鉴定. *生物工程学报*, 30 (6): 931–942]

Establishment of regeneration system and DNA barcode identification in red-fleshed kiwifruit

ZHAO Xupeng, WANG Jiyue, ZHAO Xiaopeng, LI Jieshan, CHEN Yapeng, LIU Yan*

Guiyang University, Guiyang 550005

Abstract: An *in vitro* propagation system was developed from leaf explants of red-fleshed kiwifruit (*Actinidia* sp.) from Luanchuan County in Henan Province on the basis of the callus and shoot differentiation, shoot multiplication and rooting culture. Furthermore, molecular biological identification for genetic relationship of red-fleshed kiwifruit with its relative species was carried out by four DNA barcodes (ITS, matK, SQ1 and ML). The results show that the rate of callus differentiation of the leaf explants reached to 100% on MS+0.5 mg·L⁻¹ 6-BA+2.0 mg·L⁻¹ 2,4-D. The rate of adventitious bud differentiation was 88.89% on MS+4 mg·L⁻¹ 6-BA+0.2 mg·L⁻¹ NAA in a 49-day culture period. Cultured on MS+3.5 mg·L⁻¹ 6-BA+0.2 mg·L⁻¹ NAA+0.2 mg·L⁻¹ GA₃, the proliferation rate of adventitious buds and the proliferation coefficient were 100% and 7.85, respectively. The rooting rate of adventitious buds was 92.59% with root flourishing on 1/2MS+0.2 mg·L⁻¹ IBA. The survival rate of transplantation was 94% in the mixed matrix of perlite and soil (1:4, V/V) in a 14-day culture period. The red-fleshed kiwifruit from Luanchuan County in Henan Province belongs to *A. arguta* (Ser. Lamellatae, Sect. Leiocarpae).

Key words: red-fleshed kiwifruit; plant regeneration; callus; DNA barcode

Received 2019-08-16 Accepted 2020-02-18

This work was supported by the Key Program of Education Department of Guizhou Province (Qian Jiao He KY Zi [2015]382), the Joint Foundation of Department of Science and Technology of Guizhou Province (Qian Ke He LH Zi [2015]7310), the Biology Teaching Team-the First-class Faculty-the First-class University Construction Program of Guizhou Province (2017158322), and the Special Fund of Science and Technology of Guiyang University-the Guiyang Science and Technology Bureau (GYU-KYZ[2019–2020]PT13-01).

*Corresponding author (gyly68@sina.com).