

‘红阳’猕猴桃叶盘高频直接再生体系的建立

赵许朋^{1,2}, 罗克明^{1,2}, 周月^{1,2}, 吴秀华^{1,2}, 杨立^{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

赵许朋, 罗克明, 周月, 等. ‘红阳’猕猴桃叶盘高频直接再生体系的建立. 生物工程学报, 2013, 29(11): 1599–1606.

Zhao XP, Luo KM, Zhou Y, et al. Establishment of high frequency regeneration via leaf explants of ‘Red Sun’ kiwifruit (*Actinidia chinensis*). Chin J Biotech, 2013, 29(11): 1599–1606.

摘 要: 以‘红阳’猕猴桃雌株幼叶为外植体, 直接诱导产生不定芽, 并对不定芽增殖以及生根体系进行优化, 建立了高频再生体系。结果表明, 在 MS+3.0 mg/L BA+1.0 mg/L NAA 培养基中, 不定芽诱导率达 100%, 平均出芽数达 18.67 个/叶盘; 在 MS+2.0 mg/L BA+1.0 mg/L NAA+0.1 mg/L GA₃ 培养基中, 增殖率达 100%, 1~6 代不定芽平均繁殖系数达 8.63; 不定芽在 1/2 MS+0.8 mg/L IBA 培养基中培养 15 d, 然后继代至含 1/2 MS 液体培养基的珍珠岩中培养 15 d, 生根率达 100%, 且其根系发育良好; 98 株试管苗移栽到土壤盆钵中, 成活 95 株, 成活率达 96.94%。本试验成功建立了‘红阳’猕猴桃叶片高频直接再生体系, 该体系诱导产生不定芽周期短, 出芽率高, 不定芽增殖系数大, 生根率高且根系发达, 为‘红阳’猕猴桃试管苗的工厂化生产和遗传转化奠定了基础。

关键词: ‘红阳’猕猴桃, 叶片, 不定芽, 植株再生

Establishment of high frequency regeneration via leaf explants of ‘Red Sun’ kiwifruit (*Actinidia chinensis*)

Xupeng Zhao^{1,2}, Keming Luo^{1,2}, Yue Zhou^{1,2}, Xiuhua Wu^{1,2}, Li Yang^{1,2}, and Shaohu Tang^{1,2}

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

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

Abstract: A high efficient *in vitro* regeneration protocol was developed from leaf explants of the female ‘Red Sun’

Received: March 29, 2013; **Accepted:** June 27, 2013

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 30871576).

Corresponding author: Shaohu Tang. Tel/Fax: +86-23-68252838; E-mail: tangsh@swu.edu.cn

国家自然科学基金 (No. 30871576) 资助。

网络出版时间: 2013-08-21

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20130821.1713.001.html>

kiwifruit (*Actinidia chinensis*) and the multiplication coefficient and rooting rate of adventitious buds were also optimized. This method does not require formation of callus tissues which leads to somaclonal variations. The results show that the adventitious buds developing directly from explants tissue were noticed after 30 d of culture. The maximum regeneration frequency of adventitious buds is 100% and 18.67 shoots was observed in each leaf explants when MS medium was supplemented with 3.0 mg/L BA+1.0 mg/L NAA. The optimal culture medium for bud multiplication is MS+2.0 mg/L BA+1.0 mg/L NAA+0.1 mg/L GA₃ and the multiplication coefficient reached 8.63. On the rooting medium with 1/2 MS+0.8 mg/L IBA for 15 d, the adventitious plantlets were transferred into matrix perlite supplied with 1/2 MS liquid medium for 15 d and the rooting rate reached 100%. 95 out of 98 plantlets (96.94%) survived acclimatization, producing healthy plants in the greenhouse. Taken together, a highly efficient regeneration method via leaf explants of 'Red Sun' kiwifruit was successfully established. This protocol may be useful for micropropagation and genetic transformation studies of 'Red Sun' kiwifruit.

Keywords: 'Red Sun' kiwifruit (*Actinidia chinensis*), leaves, adventitious buds, plant regeneration

猕猴桃营养极为丰富,是水果之王^[1]。中国是世界猕猴桃起源中心,也是猕猴桃生产大国,有着丰富的猕猴桃遗传资源^[2-3]。至2009年,全国猕猴桃总产量和栽培面积均居世界第一位^[3]。

'红阳'猕猴桃品质极佳,总糖含量达13.45%,高出世界流行品种'海沃德'近5%,尤其口感优于目前国内外选育的任何品种,堪称猕猴桃极品^[1]。但猕猴桃是雌雄异株植物,采用种子播种等常规繁殖方式容易造成品种退化,不利于优良性状的保持,限制了优良品种的推广^[4-5],并且猕猴桃在生产栽培中经常发生溃疡病等严重病害,导致枝条萎蔫、枯死或整株枯死^[1,6],多年调查数据显示,每年因溃疡病造成的减产在20%左右^[7]。

组织培养方法不仅可以保持品种的优良性状和实现其快速繁殖,而且以此方法为基础的遗传转化技术能将抗病基因导入猕猴桃^[8],为解决猕猴桃病害问题提供了一条新途径。叶片可经愈伤组织诱导和不定芽分化两步再生不定芽,也可由叶片一步直接再生。前者再生不定芽周期长,且在诱导过程中易发生无性系变异^[9];后者对母

本的遗传物质具有“高保真性”,很少发生变异,是植物基因工程中最好的植株再生和遗传转化系统^[10]。有关猕猴桃离体再生的研究已有不少报道^[4-5,8,11-13],但对叶片直接再生的研究较少,涉及中华系品种仅2篇^[14-15],其中'红阳'猕猴桃仅1篇^[14],且再生频率还较低,并且在农杆菌介导的遗传转化过程中,由于农杆菌的侵染和抗生素的存在,会使再生频率降低^[16-17]。因此,一个高效再生体系的建立是优良品种快速工厂化生产和遗传转化成功的关键^[18]。本试验以'红阳'猕猴桃叶片为外植体,通过叶片直接再生和不定芽增殖培养基的筛选以及良好根系的诱导形成建立了高频再生体系,为'红阳'猕猴桃试管苗的工厂化生产和抗病基因工程育种奠定了良好基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验材料为'红阳'猕猴桃 (*Actinidia chinensis* cv. 'Red Sun') 雌株当年生枝条,由重庆市绿康果业有限公司提供。

1.2 试验方法

1.2.1 叶片外植体的获得

取长约 10 cm 苗端,经常规表面消毒后接种在 MS+2 mg/L BA 固体培养基中, $(25\pm 2)^{\circ}\text{C}$ 、4 500 lx (16 h/d) 培养 30 d 后,取无菌苗 (无根苗) 的嫩叶,切成大小约 0.5 cm×0.5 cm 的叶盘用于不定芽诱导。

1.2.2 不定芽的诱导与增殖

将叶盘接种在不同不定芽诱导培养基中 (表 1),暗培养 30 d 后转入光照培养,10 d 后 (共 40 d) 统计不定芽诱导率和不定芽数量;将丛芽分离,选取长约 0.5 cm 的单个不定芽接种在不同增殖培养基中 (表 2),30 d 后统计不定芽繁殖系数 (培养后单芽总数/接种单芽数)。

1.2.3 不定芽生根

切取长 2 cm 以上的不定芽,接种在含不同浓度 IBA (表 3) 的 1/2 MS 固体培养基中诱导生根,15 d 后统计生根率和不定根数量。然后转入充分吸附 1/2 MS 液体基本培养基的珍珠岩基质中促进根系发育,15 d 后 (共 30 d) 检查根系发育状况和用于移栽。

1.2.4 基本培养基以及培养条件

接种过程在无菌条件下 (超净工作台上) 进行。每个培养基接种 48 个外植体 (4 个/瓶),3 次重复。所用基本培养基为 MS (生根为 1/2 MS),附加 30 g/L 蔗糖、8 g/L 琼脂, pH 5.8; 培养温度均为 $(25\pm 2)^{\circ}\text{C}$, 光照强度 4 500 lx (16 h/d)。除不定芽诱导阶段为暗培养外,其余阶段为光照培养。

1.2.5 试管苗移栽

将根系发育和生长良好的试管苗 (高 2 cm 以上) 的培养瓶移出培养室,在室内放置 2 d 后

逐渐打开瓶盖,炼苗 5 d;取苗,洗净根系后移栽到盛田间土壤的营养钵中,每天浇适量水,30 d 后统计移栽成活率。

2 结果与分析

2.1 植物生长调节剂对叶片不定芽再生的影响

叶盘接种后,暗培养 10 d 左右,切口开始膨大,叶脉切口明显膨大;15 d 左右出现芽点 (图 1A);30 d 后芽点发育成明显的浅绿色不定芽 (图 1B)。光照培养 10 d 后 (共 40 d),原浅绿色的不定芽转为深绿色,生长正常 (图 1C)。至 40 d,在 Y_5 、 Y_8 培养基中,叶盘出芽率均达 100% (表 1),且与其他培养基存在显著差异 ($P\leq 0.05$)。其中, Y_8 培养基出芽数最多,平均 18.67 个/叶盘,并与其他培养基存在显著差异。因此,在本试验中,‘红阳’猕猴桃叶片直接再生的最佳培养基为 Y_8 培养基,即 MS+3.0 mg/L BA+1.0 mg/L NAA。试验结果表明,‘红阳’猕猴桃叶片的直接再生需要细胞分裂素和生长素的联合作用。培养基中仅含细胞分裂素 (BA) 时 ($Y_1\sim Y_3$),叶片外植体仅膨大,不能分化出不定芽;同时含有细胞分裂素和生长素类 (NAA) 时 ($Y_4\sim Y_9$) 则可直接产生不定芽。

2.2 植物生长调节剂对不定芽增殖的影响

在不同增殖培养基中,不定芽接种后,10 d 左右开始增殖,增殖率 87.5%~100% (表 2)。通过连续 6 代的继代培养, Z_5 培养基的平均繁殖系数最高 (8.63),且不定芽生长健壮,长度普遍在 2 cm 以上 (图 1D),利于不定芽生根。因此,在本试验中, Z_5 培养基即 MS+2 mg/L BA+1.0 mg/L NAA+0.1 mg/L GA_3 为‘红阳’猕猴桃不定芽最佳增殖培养基。

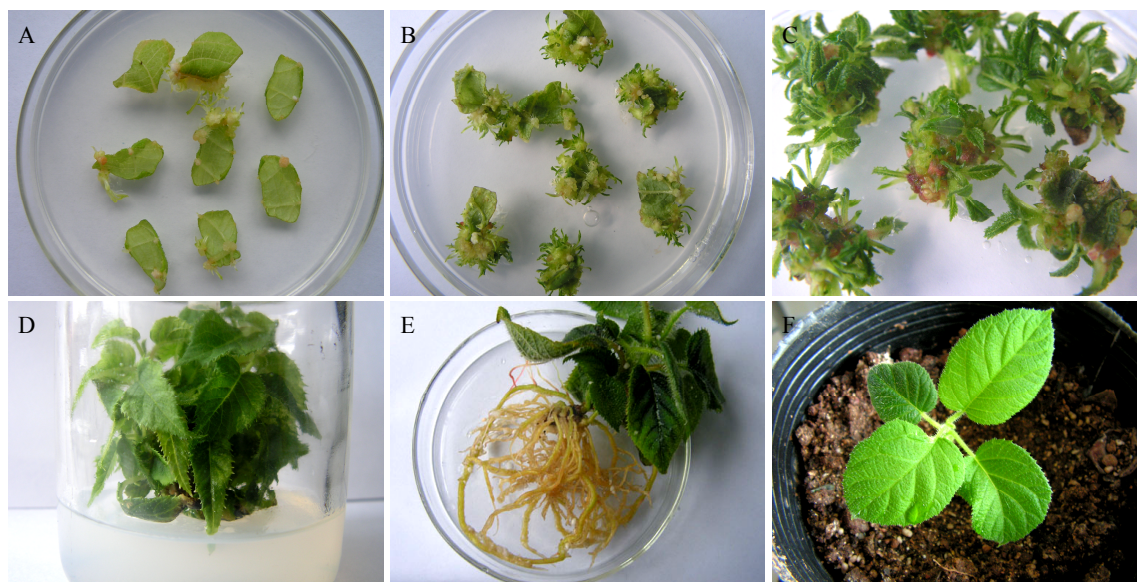


图1 ‘红阳’猕猴桃叶片植株再生

Fig. 1 Plant regeneration from leaf of ‘Red Sun’ kiwifruit (*Actinidia chinensis*). (A) Adventitious buds directly regenerated from leaves cultured in dark for 15 days. (B) Adventitious buds directly regenerated from leaves cultured in dark for 30 days. (C) Adventitious buds directly regenerated from leaves cultured in light for 10 days. (D) Multiplication of adventitious buds. (E) Rooting of adventitious buds. (F) One acclimatized plantlets after transplanting to the soil condition for 30 days.

表1 植物生长调节剂对‘红阳’猕猴桃叶片分化不定芽的影响

Table 1 Effects of plant growth regulators on dedifferentiation of buds from leaves of ‘Red Sun’ kiwifruit

Media No.	Plant growth regulators (mg/L)	No. of explants inoculated	Explants No. of buds formation	Induction rate of adventitious buds (%)	Average No. of buds per explant
Y ₁	BA 2.0	48	0	0	0
Y ₂	BA 3.0	48	0	0	0
Y ₃	BA 4.0	48	0	0	0
Y ₄	BA 2.0+NAA 0.5	48	40.33±2.52bc	84.03±5.24bc	9.33±1.53b
Y ₅	BA 3.0+NAA 0.5	48	48.00±0.00a	100.00±0.00a	10.67±2.08b
Y ₆	BA 4.0+NAA 0.5	48	35.67±2.08d	74.31±4.34d	8.67±0.58b
Y ₇	BA 2.0+NAA 1.0	48	43.33±1.53b	90.28±3.18b	13.00±2.00b
Y ₈	BA 3.0+NAA 1.0	48	48.00±0.00a	100.00±0.00a	18.67±2.08a
Y ₉	BA 4.0+NAA 1.0	48	39.00±2.65c	80.56±4.34cd	11.00±1.73b

表 2 植物生长调节剂对 ‘红阳’ 猕猴桃不定芽增殖的影响

Table 2 Effects of plant growth regulators on multiplication of adventitious buds of ‘Red Sun’ kiwifruit

Media No.	Plant growth regulators (mg/L)	Multiplied rate (%)	Propagation coefficients in clonal generations /Times						Average multiplied times
			1	2	3	4	5	6	
Z ₁	BA 1.0+NAA 0.5+GA ₃ 0.1	87.50±3.61b	5.2	5.1	4.5	5.0	4.2	4.6	4.77±0.39c
Z ₂	BA 2.0+NAA 0.5+GA ₃ 0.1	91.67±2.08b	4.8	4.6	4.7	4.0	3.5	3.8	4.23±0.54c
Z ₃	BA 3.0+NAA 0.5+GA ₃ 0.1	100.00±0.00a	4.3	3.2	3.4	3.3	3.5	3.0	3.45±0.45d
Z ₄	BA 1.0+NAA 1.0+GA ₃ 0.1	100.00±0.00a	5.4	5.0	5.2	4.7	4.3	4.0	4.77±0.54c
Z ₅	BA 2.0+NAA 1.0+GA ₃ 0.1	100.00±0.00a	9.0	9.1	9.0	8.5	8.0	8.2	8.63±0.47a
Z ₆	BA 3.0+NAA 1.0+GA ₃ 0.1	100.00±0.00a	6.9	7.1	6.4	5.8	5.5	5.0	6.12±0.82b

2.3 不定芽生根与试管苗移栽

不定芽在含 IBA 的 1/2 MS 固体培养基中, 3 d 左右不定根开始发生, 之后迅速伸长。历时 15 d 的诱导结果 (表 3) 表明, IBA 含量低于 0.8 mg/L 时, 生根率、平均根数和根长随 IBA 浓度增加而提高; 高于 0.8 mg/L 时则下降。其中, G₃ 培养基生根效果最好, 且不定根具明显侧根。在其诱导生根结束后, 在含 1/2 MS 液体培养基的珍珠岩基质中不定根得到良好发育, 15 d 后形成庞大根系 (图 1E)。因此, 在本试验中, ‘红阳’ 猕猴桃不定芽生根的最佳方法是: 在 1/2 MS+0.8 mg/L IBA 固体培养基中诱导不定根发生, 然后在含 1/2 MS 液体培养基的珍珠岩

基质中促进根系发育 (各 15 d)。经室内驯化和炼苗后, 98 株试管苗移栽到田间土营养钵中, 30 d 成活 95 株, 移栽成活率达 96.94%, 且生长良好 (图 1F)。

3 讨论

叶片直接再生不定芽时, 可经短暂愈伤阶段或不经愈伤阶段直接分化形成不定芽^[18]。在现有猕猴桃叶片直接再生的报道中, 普遍经历了短暂的愈伤阶段^[14-15,19-21], 在 不定芽诱导培养基中经过或不经过继代培养一步直接出芽。在本试验中, 叶片外植体也经历了短暂的愈伤阶段, 不经继代直接出芽。

表 3 IBA 浓度对 ‘红阳’ 猕猴桃不定芽生根的影响

Table 3 Effects of IBA concentration on rooting of adventitious buds of ‘Red Sun’ kiwifruit

Media No.	IBA (mg/L)	Buds inoculated	Rooting buds	Rooting rate (%)	Root No.	Root length (cm)
G ₀	0	48	32.33±2.52b	67.36±5.24b	1.33±0.58d	1.13±0.06d
G ₁	0.4	48	46.33±0.58a	96.53±1.20a	3.00±1.00cd	1.43±0.15c
G ₂	0.6	48	48.00±0.00a	100.00±0.00a	5.33±0.58b	2.87±0.21b
G ₃	0.8	48	48.00±0.00a	100.00±0.00a	7.67±1.15a	3.63±0.15a
G ₄	1.0	48	48.00±0.00a	100.00±0.00a	5.67±1.53b	3.03±0.21b
G ₅	1.2	48	46.00±1.00a	95.83±2.08 a	4.00±1.00bc	2.90±0.10b

在已有猕猴桃叶片直接再生报道中, 普遍存在再生频率和繁殖系数较低等问题。一是出芽时间较长、出芽率较低和出芽数较少。如中华猕猴桃‘红阳’ 60 d 出芽率为 99.33%, 出芽数为 5.2 个/叶盘^[14], “伏牛 95-2” 40 d 出芽率和出芽数分别为 87.5% 和 4.2 个^[15]; 美味猕猴桃 30~60 d 分别为 80%~100% 和 1.2~15 个^[19,21-23]; 阔叶猕猴桃 42 d 分别为 76.39% 和 5.33 个^[20]; 狗枣猕猴桃 98 d 分别为 68.7% 和 10 个^[24]; 葛枣猕猴桃 40~50 d 分别为 58%~93.3% 和 3.5~5.8 个^[25-26]。二是普遍未对再生不定芽进行继代增殖研究, 其再生系统的整体繁殖效率不确定。涉及不定芽继代培养的 2 篇报道均为中华猕猴桃, 但只进行了 1 次 (30~35d) 继代培养, 且繁殖系数较低。如‘红阳’ (35 d) 繁殖系数为 4.50^[14], 伏牛 95-2 (30 d) 为 4.76^[15]; 三是不定芽生根率较低。如 30 d ‘红阳’ 生根率为 75%^[14], 伏牛 95-2 为 86.67%^[15]。其他猕猴桃 (30 d) 有的较低, 如美味猕猴桃为 60%^[19]; 有的较高, 如美味、阔叶、狗枣和葛枣猕猴桃可达 100%^[20,22,24-27]。但图片显示, 所有报道的不定根均为棒状根, 根系不发达, 势必影响试管苗移栽后的成活和生长, 尤其是前期生长。四是进行试管苗移栽试验的较少, 且移栽成活率还较低。如‘红阳’在珍珠岩与泥炭的混合基质中 10 d 成活率为 94.67%^[14], 美味猕猴桃在温室内 3 个月成活率为 90%^[22], 阔叶、葛枣猕猴桃可移栽到田间或温室中^[20,26], 而成活率不详。

在本试验中, 叶片再生不定芽的最佳培养基为 MS+3.0 mg/L BA+1.0 mg/L NAA, 经过 40 d 培养, 出芽率达 100%, 出芽数达 18.67 个/叶盘; 不定芽增殖的最佳培养基为 MS+2.0 mg/L

BA+1.0 mg/L NAA+0.1 mg/L GA₃, 在 30 d 的继代周期中, 1~6 代平均繁殖系数达 8.63; 不定芽生根最佳培养基为 1/2 MS+0.8 mg/L IBA, 在此培养基中诱导 15 d 后, 其生根率达 100%, 经 15 d 壮根培养, 根系发达; 炼苗后试管苗在田间土营养钵中生长 30 d 后, 成活率达 96.94%。本试验较好地解决了上文中提到的猕猴桃叶片直接再生中普遍存在的一些问题, 建立了‘红阳’猕猴桃的叶片高频直接再生体系, 可为‘红阳’猕猴桃试管苗的工厂化生产和抗病基因工程提供良好的技术平台。

REFERENCES

- [1] Wang KQ, Zhou JF, Wang XB. Cultivation and management of Red Sun kiwifruit. Shanxi Forest Sci Technol, 2010, (5): 68-71 (in Chinese).
汪克强, 周建峰, 王晓兵. 红阳猕猴桃的栽培与管理. 陕西林业科技, 2010, (5): 68-71.
- [2] Zou Y, Huang M, Hou RT, et al. Analysis on inter-simple sequence repeats in 14 *Actinidia* varieties. J Southwest China Normal Univ: Natl Sci Ed, 2008, 33(1): 111-115 (in Chinese).
邹游, 黄敏, 侯若彤, 等. ISSR 标记技术在猕猴桃遗传研究中的运用. 西南师范大学学报: 自然科学版, 2008, 33(1): 111-115.
- [3] Han SM, Zhou SX, Song MZ, et al. Market status and the development strategy of kiwifruit industry of China. Heilongjiang Agril Sci, 2011, (2): 101-106 (in Chinese).
韩世明, 周赛霞, 宋满珍, 等. 猕猴桃产业的市场现状及发展对策. 黑龙江农业科学, 2011, (2): 101-106.
- [4] Yang XC, Wang BC, Ye ZY, et al. Tissue culture and rapid propagation of *Actinidia chinensis*. J Chongqing Univ: Natl Sci Ed, 2002, 25(6): 75-77 (in Chinese).
阳小成, 王伯初, 叶志义, 等. 中华猕猴桃的组织培养及其实用快速繁殖. 重庆大学学报:

- 自然科学版, 2002, 25(6): 75-77.
- [5] Liu CC, Chen ZX, Gong XQ, et al. Studies on optimization of the conditions for *in vitro* culture and plantlet regeneration of *Actinidia chinensis* cv. Jin Fu. J Southwest China Normal Univ: Natl Sci Ed, 2007, 32(5): 124-128 (in Chinese).
刘长春, 陈泽雄, 龚雪芹, 等. 金富猕猴桃离体培养与植株再生的优化研究. 西南师范大学学报: 自然科学版, 2007, 32(5): 124-128.
- [6] Mi HB, Zhang H, Liu B. Main technologies of pest management on Shaanxi organic kiwi production. Acad Period Farm Products Proc, 2007, (3): 85-87 (in Chinese).
米宏彬, 张皓, 刘斌. 陕西省有机猕猴桃生产中的有害生物管理技术要点. 农产品加工·学刊, 2007, (3): 85-87.
- [7] Liu ZD, Lü Y. Several problems in kiwifruit production. Northwest Horticulture (Fruits), 2011, (4): 5-6 (in Chinese).
刘占德, 吕岩. 猕猴桃生产中存在的几个问题. 西北园艺 (果树), 2011, (4): 5-6.
- [8] Yan JL, Zhang Y, Xing M, et al. Studies on rapid micro-propagation technique of *Actinidia chinensis* var. *rufopulpa*. J Huazhong Agril Univ, 2008, 27(1): 101-104 (in Chinese).
严姜黎, 张翼, 邢梅, 等. 红肉猕猴桃离体快速繁殖技术研究. 华中农业大学学报, 2008, 27(1): 101-104.
- [9] Zhang JE, Liu JH, Deng XX. Genetic variation of *Citrus calli* revealed by the ploidy analyser. Acta Genetica Sin, 2003, 30(2): 169-174 (in Chinese).
张俊娥, 刘继红, 邓秀新. 采用倍性分析仪鉴定柑橘愈伤组织的遗传变异. 遗传学报, 2003, 30(2): 169-174.
- [10] Ibrahim R, Debergh PC. Factors controlling high efficiency adventitious bud formation and plant regeneration from *in vitro* leaf explants of roses (*Rosa hybrida* L.). Sci Horticul, 2001, 88: 41-57.
- [11] Fu ZH, Li HL, Li Q, et al. Callus induction and plantlet regeneration from the immature embryo of *Actinidia arguta* var. *purpurea*. J Wuhan Bot Res, 2004, 22(5): 459-462 (in Chinese).
付志惠, 李洪林, 李琼, 等. 紫果猕猴桃幼胚愈伤组织诱导及植株再生. 武汉植物学研究, 2004, 22(5): 459-462.
- [12] Akbas F, Isikalan C, Namli S. Callus induction and plant regeneration from different explants of *Actinidia deliciosa*. Appl Biochem Biotechnol, 2009, 158(2): 470-475.
- [13] Kim M, Kim S C, Moon D Y, et al. Rapid Shoot propagation from micro-cross sections of kiwifruit (*Actinidia deliciosa* cv. 'Hayward'). J Plant Biol, 2007, 50(6): 681-686.
- [14] Long QJ, Wu YJ, Xie M. Tissue culture and rapid micro-propagation from leaves and stems of kiwifruit (*Actinidia chinensis* cv. Hongyang). Acta Agri Zhejiangensis, 2010, 22(4): 429-432 (in Chinese).
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. 浙江农业学报, 2010, 22(4): 429-432.
- [15] Shang XL, Ma CH, Feng JC, et al. Establishment of regeneration system from leaves of *Actinidia chinensis*. Acta Agri Jingxi, 2010, 22(4): 50-52 (in Chinese).
尚霄丽, 马春华, 冯建灿, 等. 中华猕猴桃叶片再生体系的建立. 江西农业学报, 2010, 22(4): 50-52.
- [16] Cao Y, Niimi Y, Hu SL. Meropenem as an alternative antibiotic agent for suppression of *Agrobacterium* in genetic transformation of Orchid. Agri Sci China, 2006, 5(11): 839-846.
- [17] Wu YQ, Cheng HH, Li YS, et al. Effects of antibiotics on *in vitro* leaves regeneration of apple. J Hebei Agri Sci, 2012, 16(2): 55-58 (in Chinese).
吴雅琴, 程和禾, 李玉生, 等. 抗生素对苹果离体叶片再生的影响. 河北农业科学, 2012, 16(2): 55-58.
- [18] Chen H, Li P, Liu J, et al. Establishment and optimization of the regeneration system for common dandelion (*Taraxacum officinale* Weber). Chin J Biotech, 2005, 21(2): 244-249 (in Chinese).

- 陈华, 李平, 刘晶, 等. 药蒲公英再生体系的建立和优化. 生物工程学报, 2005, 21(2): 244-249.
- [19] Fan JF, Li L, Han YF, et al. Establishment of leaf regeneration system in Kiwifruit (Qinmei). Acta Bot Boreali-Occidentalia Sin, 2002, 22(4): 907-912 (in Chinese).
- 樊军锋, 李玲, 韩一凡, 等. 秦美猕猴桃叶片最佳再生系统的建立. 西北植物学报, 2002, 22(4): 907-912.
- [20] Bi JH, Liu YL, Syed Asghar. *In vitro* organogenesis and plant regeneration from leaf explants of *Actinidia latifolia*. J Fruit Sci, 2005, 22(4): 405-408 (in Chinese).
- 毕静华, 刘永立, Syed Asghar. 阔叶猕猴桃叶片离体器官发生和植株再生. 果树学报, 2005, 22(4): 405-408.
- [21] Tian N, Xu ZQ, He JG. Establishment of high frequency and direct regeneration system of kiwifruit (*Actinidia deliciosa* Qinmei). J Wuhan Bot Res, 2007, 25(1): 79-83 (in Chinese).
- 田娜, 徐子勤, 何近刚. 猕猴桃高频直接再生体系的建立. 武汉植物学研究, 2007, 25(1): 79-83.
- [22] Prado MJ, Gonzalez MV, Romo S, et al. Adventitious plant regeneration on leaf explants from adult male kiwifruit and AFLP analysis of genetic variation. Plant Cell Tiss Organ Cult, 2007, 88: 1-10.
- [23] Zhou LY, Qin HM, Lai XY, et al. Establishment of regeneration system of kiwifruit seedlings. Guihaia, 2009, 29(4): 514-517 (in Chinese).
- 周玲艳, 秦华明, 赖幸韵, 等. 猕猴桃实生苗再生体系的建立. 广西植物, 2009, 29(4): 514-517.
- [24] Lan DW, Liu YL, Yuan TL. Organogenesis, somatic embryogenesis and plantlet regeneration from leaf explants of *Actinidia kolomikta* cultured *in vitro*. J Fruit Sci, 2007, 24(2): 218-222 (in Chinese).
- 兰大伟, 刘永立, 原田隆. 狗枣猕猴桃叶片离体培养的器官、体细胞胚形成与植株再生. 果树学报, 2007, 24(2): 218-222.
- [25] Sugawara F, Yamamoto N, Tanaka O. Plant regeneration in *in vitro* culture of leaf, stem and petiole segments of *Actinidia polygama* Miq. Plant Tissue Cul Lett, 1994, 11(1): 14-18.
- [26] 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 Forestry Res, 2004, 9(1): 85-88.
- [27] Liu YL, Lan DW, Bi JH, et al. Organ formation and plant regeneration *in vitro* of *Actinidia polygama*. J Fruit Sci, 2005, 22(3): 220-223 (in Chinese).
- 刘永立, 兰大伟, 毕静华, 等. 葛枣猕猴桃组织培养中的器官形成与植株再生. 果树学报, 2005, 22(3): 220-223.

(本文责编 郝丽芳)