

文章编号: 1000-5692(2001)02-0188-05

葡萄离体培养及快速繁殖

吴月燕, 陶伟芳

(浙江万里学院 生命科学系, 浙江宁波 315101)

摘要: 取“无核白鸡心”“美人指”“甬优一号”等3个葡萄品种0.5 cm长的单芽嫩茎作为外植体, 接种于不同配方的培养基上。结果表明“无核白鸡心”“美人指”接种于GS分别附加6-BA $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的培养基, “甬优一号”接种MS附加6-BA $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 培养基诱导芽, 芽的诱导率分别达100%, 100%和86%。当芽伸长至1.0~1.5 cm时, 3个品种均转接于MS'附加IAA $0.05 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 6-BA $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和GA₃ $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的分化培养基, 芽的分化最佳, 分化率达80%~86%, 增殖4.2倍左右, 苗生长健壮。将“无核白鸡心”转入1/2MS附加IBA $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, “美人指”“甬优一号”转入1/2MS附加IBA $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的培养基, 生根率达84%~96%, 平均根数在5~7条之间, 根生长良好。表6参10

关键词: 葡萄; 组织培养; 离体培养; 培养基; 分化; 生根

中图分类号: S663.1; Q943.1 **文献标识码:** A

葡萄 (*Vitis vinifera*) 传统繁殖方法为扦插、嫁接和压条, 虽简捷方便, 但存在着一定的弊端, 长期运用扦插、嫁接与压条繁殖, 葡萄品种退化严重, 尤其在多雨地区易受病虫害感染, 对葡萄生产的发展极为不利。组织培养能保持母本的特性并在短期内可大量繁殖。国内外已有利用茎段、叶片、茎尖和花药等组织和器官为材料进行离体培养获得愈伤组织和芽苗的成功经验^[1,2], 但对适宜外植体的选择, 各阶段培养配方的筛选, 尤其针对不同品种对培养基及培养条件的不同要求等重要问题有待探讨。本试验的3个品种(“无核白鸡心”“美人指”“甬优一号”)在浙江省很有栽培价值, 可组织培养未见报道。作者从1999年起开始, 对3个葡萄品种在不同培养基上芽的诱导与分化和其根的生长进行了筛选探索, 取得了成功, 为3个优良品种的快速繁殖提供了有效可行的途径。

1 材料与方 法

1.1 材 料

供试材料取自室内盆栽葡萄优良植株, 共3个品种: “无核白鸡心”“美人指”“甬优一号”。在生长季中, 切取各品种近梢尖^[3]的嫩茎为外植体。

1.2 方 法

1.2.1 培养基及其配制 本试验芽的诱导采用GB和MS培养基; 分化和增殖采用MS'和1/2MS培养基; 生根培养基为1/2MS。各阶段根据不同需要附加6-BA, ZIP, IAA, IBA, NAA, 2,4-D, KT, ZT

收稿日期: 2000-08-28; 修回日期: 2001-02-05

基金项目: 浙江省宁波市重点实验室基金资助项目(9941004)

作者简介: 吴月燕(1963-), 女, 浙江义乌人, 副教授, 从事果树生理研究。

和 GA₃ 等物质。所有培养基中均加 3% 蔗糖, 0.76% 琼脂, 调整 pH 值至 5.8~6.0。配制方法见参考文献[4~7]。生长调节剂均在高压灭菌前加入, 高压灭菌条件为压力 11 kg·cm⁻², 121 °C 时保持 20 min。

1.2.2 材料的消毒 将嫩茎先剥除幼叶, 修成 1~2 cm 的茎段, 然后用流水冲洗 2~3 h, 置于 70% 的乙醇液中消毒 20 s, 用无菌水冲洗 2 次, 取出后放入 1.0 g·kg⁻¹ 升汞溶液中消毒 4~10 min。采用 4 种处理: 2 min, 4 min, 6 min, 8 min, 4 次重复^[6], 无菌水冲洗 3~5 次, 并在无菌条件下, 将其切成约 0.5 cm 的茎段。接种 10 d 后统计污染率、死亡率及成活率。

1.2.3 芽的诱导 把切好的茎段接种于芽的诱导培养基上。试验共采用 (P1) MS+6-BA_{1.0}+NAA_{0.1}, (P2) MS+6-BA_{2.0}+NAA_{0.1}, (P3) MS+2,4-D_{1.0}+KT_{0.1}, (P4) MS+ZT_{2.0}+IBA_{0.5}, (P5) MS+ZT 1.0, (P6) MS+6-BA_{1.0}+KT_{0.5}+IBA_{0.5}+ZIP_{20.0}, (P7) MS+6-BA_{1.0}+NAA_{0.01}+ZIP_{20.0}, (P8) MS+6-BA_{1.0}, (P9) MS+6-BA_{2.0}, (P10) MS+6-BA_{3.0}, (P11) GS+6-BA_{1.0}, (P12) GS+6-BA_{2.0}, (P13) GS+6-BA_{3.0} 等 13 个配方。下标数字单位为 mg·L⁻¹。接种 7 d 后统计葡萄茎段的萌芽数与萌芽率。

1.2.4 芽的分化增殖生长 当芽长至 1.0~1.5 cm 时, 从原茎段上切下健壮饱满的芽, 接入分化生长培养基。试验共采用 (Y1) 1/2MS+6-BA_{1.0}+GA_{0.1}+IBA_{0.5}, (Y2) MS'+6-BA_{0.2}+IAA_{1.0}, (Y3) MS'+6-BA_{0.5}+IAA_{0.05}+GA_{2.0}, (Y4) MS'+6-BA_{1.0}+IAA_{0.05}+GA_{2.0} 共 4 个培养基, 下标数字单位为 mg·L⁻¹。接种 15 d 后观察芽的分化、增殖以及芽的生长情况, 以确定最佳培养基。分别于 10 d, 15 d, 20 d 和 25 d 后测苗高以观察 3 个品种在最佳培养基上的生长速度。

1.2.5 根的诱导 切取分化增殖培养基中茎叶生长健壮, 长度 2 cm 以上的无根苗, 转接到生根培养基中进行生根培养。培养基为 1/2MS 基本培养基, 附加 0.5~2.0 mg·L⁻¹ 不同质量浓度水平的 IBA 激素, 另加 0.5% 活性炭进行对照试验, 采用 4 次处理, 5 次重复。观察生根数及发根时间的长短和根的粗细, 以确定最佳生根培养基, 同时每隔 2 d 观察根的伸长长度。接种 10 d 后调查生根及生长情况。以上培养条件为温度 (25±2) °C, 光照强度 2 000 lx, 光照时间 11 h。

2 结果与分析

2.1 外植体的消毒

“无核白鸡心”在第 3 个处理下, 成活率高达 80%, 与最低值 42% 相差 38%, 显著高于第 1 个和第 2 个处理, 而污染率和褐死率相对较低 (表 1)。“美人指”“甬优一号”第 3 个处理成活率极显著高于第 1 个和第 2 个 (表 2~3)。因此, 葡萄外植体消毒采用 70% 的乙醇 20 s 和 1.0 g·kg⁻¹ 升汞 8 min 为宜。

表 1 不同消毒处理对“无核白鸡心”污染率、死亡率及成活率的影响

Table 1 Effect of different disinfection treatments on pollution rate, wilt rate, and survival of cv. “Wuhelajixin”

乙醇处理/s	升汞处理/min	接种数/株	污染数/株	污染率/%	褐死数/株	褐死率/%	成活数/株	成活率/%
20	4	25	14.50	58a	0	0c	10.5	42b
20	6	25	12.50	50a	1.75	7b	10.7	43b
20	8	25	2.50	10b	2.50	10b	20.0	80a
20	10	25	0	0c	12.50	50a	12.5	50ab

说明: a, b, c, ab 不同字母表示测验有显著差异, 表 2~6 同表 1 说明

表 2 不同消毒处理对“美人指”污染率、死亡率及成活率的影响

Table 2 Effect of different disinfection treatments on pollution rate, wilt rate and survival of cv. “Meirenzhi”

乙醇处理/s	升汞处理/min	接种数/株	污染数/株	污染率/%	褐死数/株	褐死率/%	成活数/株	成活率/%
20	4	25	10.00	40a	0	0b	15.00	60b
20	6	25	7.50	3ab	0.75	3b	16.75	67b
20	8	25	1.00	4b	1.00	4b	23.00	92a
20	10	25	0	0c	10.00	40a	15.00	60b

表3 不同消毒处理对“甬优一号”污染率、死亡率及成活率的影响

Table 3 Effect of different disinfection treatments on pollution rate, wilt rate and survival of cv. "Yongyou F1"

乙醇处理/s	升汞处理/min	接种数/株	污染数/株	污染率/%	褐死数/株	褐死率/%	成活数/株	成活率/%
20	4	25	15.00	60a	2.50	10.0b	7.50	30c
20	6	25	11.75	47b	2.50	10.0b	10.75	43b
20	8	25	5.00	20c	2.80	11.2b	16.50	66a
20	10	25	1.00	4d	15.00	60.0b	9.00	36c

2.2 培养基与激素对芽诱导的影响

茎段接种后, 观察发现 P7 和 P11 培养基较适合于“无核白鸡心”, P6 和 P12 培养基较适合于“美人指”, P7 和 P8 较适合于“甬优一号”。但观察中发现, P6 和 P7 培养基中初期产生的愈伤组织逐渐增加, 最后致使新长出的芽枯萎死亡。由此可见“无核白鸡心”以 P11 培养基, “美人指”以 P12 号培养基, “甬优一号”以 P8 号培养基诱导芽的效果最好(表4)。

表4 不同培养基与激素对比对葡萄芽诱导的影响

Table 4 Effect of different medium and proportion of hormone on the induction and differentiation of grapevine

培养基与激素配比	无核白鸡心			美人指			甬优一号		
	接种数/株	萌芽数/株	萌芽率/%	接种数/株	萌芽数/株	萌芽率/%	接种数/株	萌芽数/株	萌芽率/%
P1	25	0	0a	25	6.25	25a	25	3.25	13a
P2	25	0	0a	25	0	0b	25	0	0b
P3	25	0	0a	25	0	0b	25	0	0b
P4	25	0	0a	25	6.25	25a	25	6.25	25a
P5	25	5.0	20b	25	6.25	25a	25	0	0b
P6	25	12.5	50c	25	22.00	88c	25	16.25	65c
P7	25	23.0	92cd	25	18.75	75c	25	21.75	87cd
P8							25	21.5	86cd
P9							25	16.75	67c
P10							25	25.75	63c
P11	25	25.0	100cd	25	18.75	75c	25	18.50	74c
P12	25	21.5	86l	25	25.00	100cd	25	14.00	56c
P13	25	17.5	70l	25	15.75	63c			

2.3 培养基与激素对芽的分化和增殖生长的影响

使用 Y1 培养基各品种的分化率和增殖倍数均达最高, 但芽未能伸长生长。Y4 培养基中各品种的分化和增殖倍数尽管均处于中间位置, 但芽不仅分化而且伸长生长良好。综合分析 Y4 是“无核白鸡心”“美人指”“甬优一号”最佳分化增殖生长培养基(表5), 3 个品种在 Y4 培养基上的伸长情况以“无核白鸡心”生长速度最快, “甬优一号”最慢, “美人指”居中。

表5 不同培养基与激素对葡萄芽的分化增殖影响

Table 5 Effect of different medium and proportion of hormone on the differentiation and multiplication of grapevine

培养基与激素配比	无核白鸡心				美人指				甬优一号			
	接种数/株	分化数/株	分化率/%	增殖倍数	接种数/株	分化数/株	分化率/%	增殖倍数	接种数/株	分化数/株	分化率/%	增殖倍数
Y1	80	75	93.8a	4.4	80	77.5	96.9ac	4.5	80	78	97.5a	4.8
Y2	80	7	83.0a	2.1	80	10	12.5b	2.3	80	8	10.0a	2.3
Y3	80	50	62.5b	3.6	80	52	65c	3.6	80	60	7.5b	3.7
Y4	80	64	80.0a	4.1	80	66	82.5c	4.3	80	69	86.3a	4.2

2.4 激素对根诱导的影响

当 IBA 的质量浓度为 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, “无核白鸡心”的生根率 84%, 显著高于其他浓度水平; 而

当 IBA 为 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, “美人指” “甬优一号” 的生根率达 96% 和 90%, 极显著高于其他浓度水平 (表 6)。

表 6 不同激素水平对葡萄试管苗生根的影响

Table 6 Effect of different level of hormone on the shoot rooting of grapevine

IBA 质量浓度/ ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	无核白鸡心				美人指				甬优一号			
	接种数/	生根数/	生根率/	每株生根	接种数/	生根数/	生根率/	每株生根	接种数/	生根数/	生根率/	每株生根
	株	株	%	数/条	株	株	%	数/条	株	株	%	数/条
0.5	10	8.4	84ab	5.0	10	4.8	48a	5.1	10	0	0a	0
1.0	10	5.6	56b	4.8	10	966	96ab	7.0	10	9	90bc	5.2
1.5	10	368	38b	2.2	10	6.2	62a	3.4	10	4.2	42b	2.4
2.0	10	0	0c	0	10	2	20c	2.0	10	0	0a	0

待生根后, 3 个品种在各自的最佳培养基上均能良好生长。“无核白鸡心” 生长速度比较匀速, “美人指” 相对 “甬优一号” 生长速度快, “美人指” 整个试验期生长均快, 而 “甬优一号” 前期 (2~6 d) 生长慢, 后期 (6~12 d) 生长加快。

3 讨论与结论

试验证明, “无核白鸡心” “美人指” “甬优一号” 等 3 个葡萄品种的单芽茎段培养成活、芽的诱导、分化增殖和生根受接种材料、消毒和培养基成分诸因素的制约和影响。

取自室内盆栽的外植体带菌量少, 降低污染率。采用生长季中的近副梢类的嫩茎段, 通常细胞分裂旺盛, 生长势旺, 易成活。材料消毒时间过长, 污染率虽低, 但褐死严重; 而过短, 尽管褐死降低, 但污染率偏高。本试验的 3 个品种以 70% 乙醇 30 s 和 $1.0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 升汞 8 min 消毒效果最理想。“甬优一号” 的成活率相对较低, 可能是该品种对药品升汞较敏感, 导致褐死率相对偏高。

茎段初次培养中 (芽的诱导), “无核白鸡心” “美人指” 同属欧亚种群, 适应于同一培养基 GS, 但两者对激素 6-BA 的浓度要求有所差异。“无核白鸡心” 以 P11 培养基效果最优, 而 “美人指” 要求激素 6-BA 的浓度稍高一些, 以 P12 培养基效果最理想。不同品种对培养基有不同要求, 这与许多研究者报道的是一致的^[2,4,6,8]。“甬优一号” 是欧美杂交种, 对 GS 基本培养基不适合, 而适合于 MS 基本培养基, 并以 P8 培养基效果最佳。观察发现 (表 4) P6 和 P7 培养基中最终产生了愈伤组织, 2 个培养基中都含有细胞分裂素 (6-BA, ZIP 和 KT) 和生长素 IBA (P6 培养基) 及 NAA (P7 培养基)。细胞分裂素有诱导芽并促进腋芽生长的作用^[4,10]。在培养初期, 细胞分裂素和生长素同时起作用, 愈伤组织和芽均诱导产生, 但由于生长素的浓度相对较高, 在后期致使已萌发的芽枯萎并产生大量愈伤组织, 表 4 中的 P6 和 P7 培养基只适合于愈伤组织诱导, 而不宜于本试验芽的诱导。

在葡萄芽的增殖生长中, 通过选择适宜的培养基或调节激素种类与浓度配比, 在同一阶段能完成芽的分化与伸长成苗, 可加快繁殖速度。如在 Y1 培养基上, 芽只能分化为丛生芽而不能伸长, 形不成苗; 但在 Y4 培养基 (表 5) 上分化和增殖伸长同时进行, 苗生长良好。这一结果与董晓玲等报道^[9] 有一定的出入。董晓玲等认为该培养基使芽丛大量分化且幼茎呈畸形, 而本试验表明 3 个品种在 Y4 培养基上不仅能正常促进已诱导的芽丛分化, 还能诱导芽丛生长为幼茎。这可能由于品种的差异以及在本试验灭菌条件下 IAA 破坏较少, 因此伸长作用较明显。较高浓度的细胞分裂素 6-BA 能抑制芽的顶端优势, 使腋芽发育, 分化大量芽丛, 这与董晓玲等有类似观点^[9]。但与另一观点 “要使芽丛发育为幼茎需降低 6-BA 浓度或提高 IAA 浓度” 有一定出入。试验表明: 降低 6-BA 浓度 (如 Y3 培养基) 对芽伸长为幼茎产生一定影响, 但会使芽的分化率及增殖倍数降低。在本试验中, $6\text{-BA } 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 与 $\text{GA}_3 2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的浓度配比下, 使芽既分化又健壮生长。由此可见, GA_3 能促使分化芽伸长为幼茎。

在生根培养过程中激素 IBA 不宜不高也不宜过低^[4,8]。过高会出现茎段基部产生大量愈伤组织,

抑制发根抽茎, 过低会出现茎段基部不发根或生根条数少的现象(如“甬优一号”)。而适当浓度的 IBA 不仅发根长根速度快, 而且生长粗壮, 侧根多, 呈白色。经试验“无核白鸡心”以 $1/2MS+IBA_{0.5}+0.5\%$ 活性炭为佳, 对 6-BA 的浓度要求较低, 而“美人指”“甬优一号”在较高的 6-BA 的浓度下才能促进正常发根生长, 以 $1/2MS+IBA_{1.0}+0.5\%$ 活性炭培养基生根效果最佳。

参考文献:

- [1] 曹孜义. 葡萄组织培养译文集[M]. 兰州: 甘肃科学技术出版社, 1989. 15—50.
- [2] Morel G L. Development demillion surdes tissues de vigne cultures in vitro. *Acaid sci Paris*, 1944. **218**. 50—52.
- [3] 余旦华. 外植体的来源不同对葡萄茎尖培养中组织褐化以及成梢量的影响[J]. 国外农学—果树, 1987 (3): 12.
- [4] 曹孜义, 刘中民. 实用植物组织培养技术教程[M]. 兰州: 甘肃科学技术出版社, 1996. 21—86.
- [5] 欧风光, 郭应翔. 猕猴桃的组织培养及其组培苗的果园产果[J]. 植物生理学通讯, 1994 (6): 435.
- [6] 朱文勇, 毛静琴, 罗春香, 等. 瑰宝葡萄新品种单芽茎段培养与繁殖的研究[J]. 山西果树, 1991 (2): 17—19.
- [7] 黑井伊作. 关于巨峰葡萄芽茎尖培养的奈乙酸及苄基腺嘌呤最适浓度研究[J]. 于振忠译. 国外农学—果树, 1986 (1): 3.
- [8] Mullins M G, Srinivasan C. Somatic embryos and plantlets from an ancient clone of the grapevine (cv. Cabernet-sauvignon) by apomixis in vitro. *J Exp Bot*, 1976, **27** (100): 1 022—1 030.
- [9] 董晓玲, 李世诚, 金佩芳, 等. 几种激素对葡萄茎尖培养的影响[J]. 上海农业科技, 1990 (3): 38—39.
- [10] Krul W K, Worley J F. Formation of adventitious embryos in callus cultures of “seyval”, a French hybrid grape. *J Ame So Hor Sci*, 1997, **102** (3): 360—363.

Tissue culture and propagation in grape

WU Yue-yan, TAO Wei-fang

(Department of Life Science, Zhejiang Wanli University, Ningbo 315101, Zhejiang, China)

Abstract: Taking the stems of 0.5 cm with single bud as the explants to the different culture mediums, the results showed that the rates of differentiation of buds that were the highest in all treatments were 100% for cv. “Wuhebaijixin”, and cv. “Meirenzhi” and 86% for cv. “Yongyou F1” on the GS medium containing 6-BA 1.0 $mg \cdot L^{-1}$ or 6-BA 2.0 $mg \cdot L^{-1}$. When the buds grew 1.0 ~ 1.5cm, they were transferred to the MS' medium supplemented with IAA 0.05 $mg \cdot L^{-1}$ or 6-BA 1.0 $mg \cdot L^{-1}$ or GA 2.0 $mg \cdot L^{-1}$ with the differentiation rate of 80% ~ 86% and the proliferation multiple of 4 for this three varieties and the shoots grew vigor, which were the most favourite medium for the induction and differentiation of buds in this test. If the grape of “Wuhebaijixin” was changed into the 1/2 MS medium containing IBA 1.0 $mg \cdot L^{-1}$ and “Meirenzhi” and “Yongyou F1” were changed into 1/2 MS medium containing IBA 2.0 $mg \cdot L^{-1}$, the shoots developed nice roots with rooting rate of 84% ~ 96% and rooting number of 5 ~ 7. These media were the most significant for rooting in all treatments.

Key words: grape; tissue cultures; culture in vitro; culture media; differentiation (biology); rooting