

葡萄侧芽再生体系研究

李璐, 王禹, 盛艳艳, 焦奎宝, 刘丹, 高庆玉

(东北农业大学园艺学院 黑龙江 哈尔滨 150030)

摘要: 分别以京亚、京秀、杂交品系 22 号 3 种葡萄单芽茎段为外植体, 通过对消毒方法、取材季节及培养基等因素的试验研究, 分别得出 3 种葡萄的最适离体快繁培养条件。

关键词: 葡萄; 离体培养; 快繁

中图分类号: S 663. 103. 6 文献标识码: A 文章编号: 1001—0009(2009)08—0071—03

葡萄是重要的浆果果树, 既有很强的适应性又有极高的经济效益, 栽种面积广泛。葡萄也是最先进行组织培养的作物之一, 组织培养技术是其快速繁殖的一个重要途径^[1]。20 世纪 90 年代以来, 葡萄的快繁技术得到了快速的发展。该试验的葡萄品种为黑龙江省普栽品种京亚、京秀及东北农业大学高庆玉教授培育的新品系 22 号, 通过试验找出 3 种葡萄品种的无菌苗最适培养条件, 为以后建立遗传转化体系及多倍体诱导奠定基础。

1 材料与方法

试验材料采自东北农业大学园艺学院葡萄园的京亚、京秀和品系 22 号葡萄。5~10 月份外植体选用长势良好的植株嫩枝及顶芽, 1~2 月份外植体采自于休眠枝冬芽在室内抽生的嫩枝。剪去大叶片, 用流水冲洗 30 min 后, 剪切成长为约 5 cm 段, 在无菌条件下, 投入 75%酒精内消毒 5 s, 再用 0.1%升汞溶液浸泡, 1~2 月份外植体浸泡 3 min, 5~8 月份外植体浸泡 5 min, 9~10 月份外植体浸泡 10 min。消毒后用无菌水冲洗 3~4 次, 用无菌滤纸吸干水分后剪成单芽小段, 接种在不同培养基上。培养基均湿热灭菌^[2], 121~126℃保持

20 min, 培养过程中, 每日光照 13 h, 光强 1 500~2 000 lx, 温度 26℃, 湿度 75%^[1,2,4]。试验数据采用 SPSS 进行分析。

2 结果与分析

2.1 不同月份取材对葡萄无菌苗体系建立的影响

由表 1 可见, 取材季节对 3 种葡萄侧芽的萌发有着极大的影响, 1、2 月份的材料因在室内生长, 污染率褐化率都不高, 但因是休眠芽, 因此成活率低且成苗质量也不好, 其中京秀的生长状况差。在 5、6 月份 3 种葡萄的新梢侧芽萌发率都远高于其它月份, 且芽生长迅速、状况良好, 尤其是京秀。进入 7 月份后随着温度的升高及湿度的增加, 材料的污染率有所上升, 影响了成活率, 其中对京亚的影响最大, 对品系 22 号影响最小, 其生长状况与 5、6 月份差别不大。到 9、10 月份后, 随着材料木质化程度的增加, 3 种葡萄的褐化率均逐渐增高, 也因材料老化, 消毒剂的毒副作用减小, 死亡率下降。由此可以看出, 3 种葡萄的最佳取材时间为 5~6 月份, 不同季节的取材对京亚葡萄的影响最大, 京秀次之, 而对 22 号影响最小, 在每个季节都能较好的生长。

2.2 不同培养基对 3 个品种腋芽萌发的影响

初代培养以 3 种培养基 MS、B5、GS, 分裂素 6-BA 的 0.5、1.0、1.5 mg/L 3 个浓度和生长素 NAA 的 0.01、0.05、0.1 mg/L 3 个浓度进行三因素三水平正交试验。

由表 2 可以看出, 京亚葡萄在 6-BA 1.0~1.5 mg/L 的浓度间, NAA 0.01~0.05 mg/L 浓度间萌芽效果最好, 不但萌芽迅速、健壮、愈伤少而且后期生长好, 平均芽高为 2.7 cm; 京秀葡萄在 6-BA 0.5~1.0 mg/L 浓度

表 1 不同月份取材对 22 号葡萄无菌苗体系建立的影响

Table 1 Effect of different months to obtain plants of No.22 on establishing systems in vitro

时间 Time	1~2 月份			5~6 月份			7~8 月份			9~10 月份		
	京亚	京秀	22 号	京亚	京秀	22 号	京亚	京秀	22 号	京亚	京秀	22 号
污染率 Rate of Contamination	20.1	15.2	17.7	12.2	10.2	15.0	20.2	20.0	24.2	29.9	35.0	26.9
褐化率 Rate of browning	19.0	15.2	15.7	11.6	11.0	12.5	16.0	12.6	18.2	32.2	25.5	45.7
死亡率 Rate of death	43.1	40.0	45.1	29.8	29.0	20.7	35.2	20.1	25.3	19.0	19.0	10.9
萌芽率 Rate of sproutin	17.0	29.6	27.5	46.4	49.8	59.5	28.6	47.3	41.4	18.9	20.5	16.1

第一作者简介: 李璐(1981-), 女, 辽宁沈阳人, 在读硕士, 研究方向为果树学。E-mail: xuesong0767@sina.com。
通讯作者: 高庆玉(1960-), 男, 博士, 教授, 黑龙江省果树学科带头人, 主要从事逆境生理学及果树栽培学等课程教学工作, 现任中国园艺学会小浆果分会副理事长, 黑龙江省园艺学会常务理事。E-mail: gaoqingyu@tom.com。
收稿日期: 2009-03-20

间, NAA 0.01 mg/L 水平上萌芽效果最好, 芽健壮, 少愈伤。22 号在 6-BA 0.5~1.0 mg/L 浓度间, NAA 0.01~0.05 mg/L 浓度间萌芽效果最好。由此可得出京亚的最适初代培养基为处理 9; 京秀、品系 22 号的最适初代培养基均为处理 1。

表 2 不同培养基对 3 种葡萄单芽茎段萌发的影响
Table 2 Effect of different media on lateral buds sprouting of three grapes

处理号 No. of Treatment	培养基 Media	6-BA /mg·L ⁻¹	NAA /mg·L ⁻¹	平均萌芽率 Average rate of sprouting/%	京亚	京秀	22 号
1	MS	0.5	0.01	42.3 ^{abA}	53.0 ^{aA}	49.0 ^{aA}	
2	MS	1.0	0.05	35.3 ^{bA}	25.3 ^{dC}	20.6 ^{bcABC}	
3	MS	1.5	0.1	1.7 ^{cB}	13.7 ^{eD}	0.0 ^{cC}	
4	B5	0.5	0.05	34.7 ^{abA}	38.3 ^{bcA}	48.6 ^{aA}	
5	B5	1.0	0.1	4.3 ^{cB}	2.7 ^{eE}	5.5 ^{bcC}	
6	B5	1.5	0.01	43.3 ^{abA}	27.3 ^{dC}	34.3 ^{abAB}	
7	GS	0.5	0.1	7.6 ^{cB}	45.3 ^{bcAB}	12.0 ^{bcC}	
8	GS	1.0	0.01	50.3 ^{aA}	51.0 ^{abA}	48.0 ^{aA}	
9	GS	1.5	0.05	45.0 ^{abA}	20.3 ^{dCD}	33.3 ^{abA}	

注 Duncan's 新复极差法测验小写字母 5%显著水平, 大写字母 1%显著水平。

2.3 不同培养基对 3 个品种增殖的影响

继代培养基选用 B5 添加 6-BA, 浓度分别为 0.5、1.0、2.0 mg/L 和 IBA 浓度为 0.05、0.1、0.2 mg/L 进行二因素三水平正交试验增殖试验。从表 3 可得, 京亚葡萄的最适增殖培养基为 8 号, 平均增殖倍数为 3.3。此处理不但萌芽迅速而且后期生长好; 3 号培养基为最差培养基, 几乎不能增殖, 而且有大量愈伤组织产生。处理 8 对京秀葡萄同样有很好的增殖影响, 平均增殖倍数为 3.7, 且生长良好。处理 5 对京秀的增殖也有明显的影响, 但苗较弱, 后期生长不好。处理 9 对品系 22 号葡萄增殖效果最好, 增殖倍数达到 4.1, 也是 3 种葡萄中增殖倍数最高的。

表 3 不同培养基对继代增殖的影响
Table 3 Effect on subculture in different media

处理号 No. of Treatment	6-BA /mg·L ⁻¹	IBA /mg·L ⁻¹	平均萌芽率 Average rate of sprouting/%	京亚	京秀	22 号
1	0.5	0.01	1.3 ^F	1.6 ^{dDE}	2.0 ^{d+DE}	
2	0.5	0.1	2.0 ^{DE}	1.7 ^{dDE}	2.1 ^{dD}	
3	0.5	1.0	1.1 ^{EF}	1.1 ^{dE}	1.5 ^{FE}	
4	1.5	0.01	2.3 ^{BCD}	2.6 ^{ABC}	2.8 ^{bcBC}	
5	1.5	0.1	2.6 ^{BC}	3.3 ^{aAB}	3.2 ^{bB}	
6	1.5	1.0	1.4 ^{EF}	2.1 ^{cCD}	2.2 ^{cCD}	
7	2.5	0.01	1.8 ^E	1.7 ^{dDE}	1.6 ^{dDE}	
8	2.5	0.1	3.3 ^{aA}	3.6 ^{aA}	3.0 ^{bdB}	
9	2.5	1.0	2.9 ^{AB}	2.7 ^{ABC}	3.7 ^{aA}	

2.4 芽的生根培养

当无根苗长至 2~3 cm 时接入生根培养基, 1/2MS 附加不同种类及浓度的生长素, 从图 1 中可以看出, 京亚葡萄在 IBA 浓度为 1.5~2.5 mg/L 时, 生根率均达到 50%以上, 在 IBA 的 2.0 mg/L 水平上生根率最高为 73.1%, 单芽平均根数达到 5.1 条, 且主根粗壮, 侧根多, 平均达到 4.2 cm, 最长的达到 5.5 cm。京秀葡萄在 IBA

0.5 mg/L 水平上生根率达到最高的 91%。单芽平均根数为 4.8 条, 侧根平均长 4.6 cm, 且生长均匀。当 IBA 浓度达到 2.0 mg/L 生根率开始急剧下降, 同时红叶现象开始出现, 当 IBA 浓度达到 3.0 mg/L 时, 只产生根源基, 没有根长出, 红叶现象严重, 苗出现死亡。22 号葡萄在 IBA 浓度水平为 0.5~2.0 mg/L 之间, 生根率为 35%以上, 在浓度为 1.0 mg/L 水平时, 为最高的 76.1%。品系 22 号在 3 种葡萄中相对最不易生根, 但根的生长较迅速, 平均第 9 天就开始生长第一条根。综合分析, 京亚葡萄的最适生根培养基均为 1/2MS+IBA (2.0 mg/L); 京秀葡萄的最适生根培养基均为 1/2MS+IBA (0.5 mg/L); 品系 22 号的最适生根培养基为 1/2MS+IBA (1.0 mg/L)。

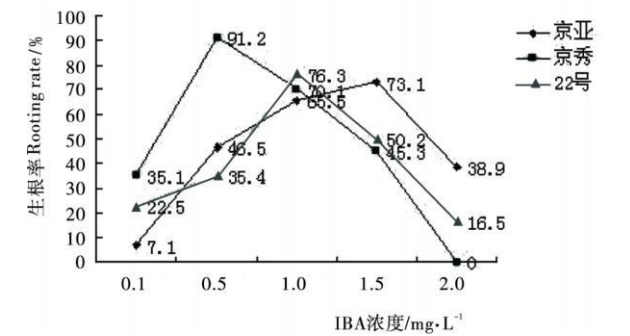


图 1 不同浓度 IBA 对生根的影响
Fig.1 Effects on rooting of different concentration of IBA
注: 1/2MS 为大量元素和碳源减半, 其它正常。

3 讨论

在增殖过程中, 京亚和 22 号有 82% 为丛生芽的方式增殖, 而京秀只有较少的生成丛生芽, 有 71% 以上腋芽生长为单根嫩梢, 以嫩梢扦插方式增殖。在后期生长中, 丛生芽虽然增殖倍数高, 但芽较弱, 而且有畸形芽。而扦插型芽虽增殖倍数相对稍低, 但芽健壮, 生长迅速, 无畸形芽。这可能与 3 种基因型本身的内源激素不同, 在相同的外源激素作用下而表现出了不同。

在生根试验中, 京亚所需的生长素浓度最高, IBA 达到 2.0 mg/L, 在较低浓度下只产生较少根源基没有根生成, 这与室外的嫩枝扦插时极易生根情况不同。这也许是因为京亚品种对细胞分裂素较敏感, 在增殖过程中积累了过多的激素, 从而影响了其分裂素与生长素的比例, 产生了生根难的现象。

参考文献
[1] 曹汝义, 刘国民. 实用植物组织培养技术教程[M]. 兰州: 甘肃科学技术出版社, 1999: 41-46, 23-26, 59.
[2] 曹汝义, 李胜. 现代植物组织培养技术[M]. 兰州: 甘肃科学技术出版社, 2003: 24-31.
[3] 朱德蔚. 植物组织培养与脱毒快繁技术[M]. 北京: 中国科学技术出版社, 2001: 4-10.
[4] 李俊明. 植物组织培养教程[M]. 北京: 北京农业大学出版社, 1992: 347.

胡萝卜体细胞胚再生系统的建立

高金秋^{1,2}, 于丽杰¹

(1. 哈尔滨师范大学 生命科学与技术学院 黑龙江 哈尔滨 150025; 2. 白城师范学院 生物系 吉林 白城 137000)

摘 要: 选用胡萝卜栽培品种“开拓者”和“长城红玥”无菌苗的子叶和下胚轴作外植体, 对可能影响胡萝卜体细胞胚分化率的基本培养基、激素配比进行了研究。结果表明: 开拓者对 B5 培养基表现适应, 长城红玥对 B5 和 MS 培养基均表现适应。下胚轴外植体诱导体细胞胚的分化能力极显著地高于子叶。低浓度的 2,4-D(0.1~0.7 mg/L) 对体细胞胚的分化有促进作用, 6-BA 对体细胞胚分化有抑制作用。诱导开拓者下胚轴分化体细胞胚的优化培养基为 B5+2,4-D 0.1 mg/L, 分化率达 85%。诱导长城红玥下胚轴分化体细胞胚优化培养基为 MS+2,4-D 0.7 mg/L, 分化率达 73.3%。2 个品种的下胚轴在各自的优化培养基上分化体细胞胚的能力差异不显著。

关键词: 胡萝卜; 体细胞胚; 组织培养

中图分类号: S 631.203.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2009)08-0073-05

胡萝卜 (*Daucus carota* L.) 又名红萝卜、丁香萝卜、药性萝卜等, 是伞形科胡萝卜属的 2 a 生草本植物。因其营养丰富、又具药用价值, 且耐运输、易栽培、病虫害少和耐贮藏, 而成为人们常食蔬菜。同时又因其可食部分—贮藏根具有发达的韧皮部, 适合表达外源蛋白, 使很多科研工作者乐于用它作为植物生物反应器的受体^[1-3]。

第一作者简介: 高金秋(1976-), 女, 硕士, 讲师, 研究方向为植物分子生物学, 现从事基因工程及植物组织培养的教学工作。E-mail: wawa760824@yahoo.com.cn。
通讯作者: 于丽杰(1961-), 女, 博士, 教授, 现从事植物分子生物学的教学与科研工作。E-mail: yulijie1961@126.com。
基金项目: 黑龙江省自然科学基金资助项目(C0014); 哈尔滨市学科后备带头人基金资助项目(0071007002); 黑龙江省普通高等学校骨干教师创新能力资助项目。
收稿日期: 2009-03-20

因此, 建立胡萝卜的优良再生系统, 已经越来越受到人们关注。

早在 1958 年, Steward 和 Reinert 就已经从胡萝卜的愈伤组织通过体细胞胚途径诱导产生了完整植株; 随后在 1972 年, Granbow 又用胡萝卜的根和叶柄作为外植体通过体细胞胚途径诱导产生了再生植株; 之后关于胡萝卜组织培养的研究、体细胞胚发生机制的研究以及近 30 年来关于胡萝卜遗传转化的研究一直接连不断。目前用于胡萝卜离体培养产生体细胞胚的培养基差别很大, 基础培养基主要涉及 B5 和 MS, 所用激素的种类和浓度的差别就更大^[1-8]。

近年来, 育种者不断培育出新的胡萝卜优良品种。由于基因型的影响, 对不同的胡萝卜品种进行离体再生时, 所适应的培养基配方可能要发生相应的变化。该试验通过对培养基组成、外植体类型和品种进行筛选, 优

Study on Grapes Lateral Bud Stem Apex Regeneration System

LI Lu, WANG Yu, SHENG Yan-yan, JIAO Kui-bao, LIU Dan, GAO Qing-yu
(Horticulture College, Northeast Agricultural University, Harbin, Heilongjiang 150030, China)

Abstract: Took stems with single bud of the three types of grape, Jingya, Jingxiu and Hybrid strain No. 22 as explants. Studied on several factors such as disinfection methods, seasonal selections and medias, and educed the most suited rapid propagation *in vitro* of the three types of grapes.
Key words: Grape; *In Vitro*; Rapid propagation