

宁夏三个葡萄品种高效再生体系的建立

王敬东^{1,2}, 张 丽^{1,2}, 马洪爱¹, 陈晓军¹, 关雅静¹, 宋玉霞^{1,2}

(1. 宁夏农业生物技术重点实验室, 宁夏 银川 750002; 2. 北京林业大学 林木育种国家工程实验室, 北京 100083)

摘 要:以宁夏葡萄产业中大量种植的 3 个葡萄品种为试材建立再生体系。采用花药、茎尖进行愈伤组织诱导, 比较了 3 种葡萄用花药、茎尖培养诱导愈伤组织形成、分化、生根的必须培养条件, 获得不定芽分化再生植株。结果表明: 葡萄花药愈伤组织形成胚性愈伤组织的能力很低, 几乎不能分化成苗; 而茎尖愈伤组织形成胚性愈伤组织的能力很高, 分化成苗率极高, 达 100%。B5 培养基诱导宁夏葡萄茎尖愈伤组织和分化丛生效果最好; KT 有利于愈伤组织分化; 茎尖浓度以 0.8~1.0 cm 最好。

关键词:葡萄; 花药; 茎尖; 胚状体; 再生体系

中图分类号:S 663.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2011)22-0118-04

葡萄组织培养不仅能加快优良品种的繁殖和推广速度, 而且为发展脱毒植株开辟了新的途径。关于葡萄植物组织培养方面已有大量的文献报道^[1-2], 曾建国等^[3]以“巨峰”葡萄的带芽茎段为外植体, 进行快繁育苗。吴伟民等^[4]以“宿晓”红葡萄单芽茎段为外植体进行离体培养。张爱华等^[5]利用茎尖培养获得新疆“紫香无核”葡萄脱毒苗。

目前, 茎尖组织培养是植物组织培养的常规技术, 已被广泛应用^[6]。90%的葡萄植株再生都是通过愈伤组织间接再生的^[7]。廖文雪等^[8]以刺葡萄叶片为材料诱导出愈伤组织, 但愈伤组织未能分化出芽, 只分化出了不定根。陈莉等^[6]以玉米茎尖分生组织为材料进行了诱导胚性愈伤组织的研究。

我国从 1979 年开始葡萄组织培养研究, 为葡萄脱毒植株的培养奠定了基础。该研究是在前人工作的基础上, 以宁夏葡萄产业中大量种植的 3 个葡萄品种为材料, 对组织培养外植体选择、培养基及植物生长调节剂等关键技术进行更深入研究, 建立茎尖愈伤组织培养葡萄再生植株技术体系, 为宁夏葡萄建立无性繁殖体系及获得脱毒苗提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为宁夏主栽葡萄品种“霞多丽”(干白)、“赤霞珠”(干红)、“红地球”(鲜食), 2009 年 5 月 31 日采自宁夏农林科学院芦花台园林场, 放 4℃ 冰箱保存、备用。

1.2 试验方法

1.2.1 葡萄花药愈伤组织的诱导 取葡萄小孢子四分体期到单核期的花药进行接种。取回的花蕾放入 4℃ 冰箱预处理 5~8 d。花蕾用 75% 的酒精浸泡 10 s, 0.1% 升汞消毒 8 min, 无菌水冲洗 3~5 遍后, 取不同部位的小花, 剥离花药, 接种于不同植物生长调节剂组合的诱导培养基中。培养温度 (26±1)℃, 暗培养, 待愈伤组织长出后, 转到 2 000 lx 下进行光培养, 光照 14 h/d。

1.2.2 葡萄茎尖愈伤组织的诱导 将葡萄茎尖用 75% 酒精浸泡 15 s, 0.1% 升汞消毒 12 min, 无菌水冲洗 3~5 遍后, 在解剖镜下剥离掉幼叶, 切取 0.8~1.0 mm 的茎尖分生组织接种于不同植物生长调节剂组合的诱导培养基中进行培养。光照培养 8 h/d, 光照强度 2 000 lx, 培养温度 (26±1)℃。

1.2.3 愈伤组织分化培养 愈伤组织长到 2~3 mm 大时, 选择颗粒状愈伤转到分化培养基中进行分化培养。20 d 左右分化出丛生芽, 待其长至 1~2 cm 时, 接种于不同植物生长调节剂组合的培养基中进行增殖培养。培养温度 (25±1)℃, 光照强度 2 000 lx, 光照 14 h/d。

1.2.4 生根培养 待再生植株高 3~4 cm 时, 选取健壮植株切取 1.5 cm 左右的带顶芽茎段作外植体, 接种于不同生长素的 1/2MS 培养基中进行生根培养, 培养温度 (25±1)℃, 光照强度 2 000 lx, 光照 14 h/d。

第一作者简介: 王敬东(1969-), 女, 本科, 助理研究员, 现主要从事设施栽培植物组织培养及脱毒研究工作。E-mail: wangjd2008@163.com。

责任作者: 宋玉霞(1963-), 女, 硕士, 研究员, 现主要从事植物生物技术育种研究工作。E-mail: Songyx666@163.com。

基金项目: 北京林业大学林木育种国家工程实验室开放课题资助项目(FOD2010-b)。

收稿日期: 2011-08-11

1.3 数据分析

结实率用 DPS 数据处理系统进行处理,差异显著性分析采用 Duncan's 新复极差法,显著水平为 0.05。花药愈伤组织诱导率=愈组数/花药数;茎尖愈伤组织诱导率=愈组数/茎尖数;分化率=丛生芽数/愈组数。

2 结果与分析

2.1 不同培养基对葡萄花药诱导愈伤组织的影响

花药经诱导培养 30 d 左右产生愈伤组织,从形态上根据色泽和质地可分为 3 类:第 1 类:糊状(图 1, A),非胚性愈伤组织(Non-embryogenic callus, NEC),稍有黄色或清白色,均匀铺展,质地松软,无定形;第 2 类:粉状(图 1, B),非胚性愈伤组织,粉白色或杂色,结构疏松,亦无定形。第 3 类:颗粒状(图 2, A、B),胚性

愈伤组织(Embryogenic Callus, EC)。质地紧密,生长缓慢;“霞多丽”、“赤霞珠”花药愈伤组织 83% 为 NEC, 17% 为 EC,但生长过程中逐渐褐化。“红地球”愈伤组织 46% 为 EC(表 1)。

以葡萄花药为外植体,在添加不同植物生长调节剂的 MS、B5、GS 3 种培养基上分别进行愈伤组织诱导。通过方差分析可知,培养基间、品种间差异显著。其中 GS 培养效果最好,诱导出的愈伤组织颗粒状多于 B5 和 MS 培养基。不同植物生长调节剂对愈伤组织的诱导影响很大,6-BA 诱导效果比 KT 好,在添加 6-BA 培养基中诱导出的 EC 较多。添加 TDZ 的 3 种培养基均未诱导出愈伤组织。“红地球”的诱导率高于“霞多丽”、“赤霞珠”(表 1)。

表 1 不同培养基对葡萄花药诱导愈伤组织影响

编号	培养基	植物生长调节剂/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$					花药数/枚			愈组数/块及形态			诱导率/%		
		TDZ	6-BA	KT	2,4-D	NAA	“霞多丽”	“赤霞珠”	“红地球”	“霞多丽”	“赤霞珠”	“红地球”	“霞多丽”	“赤霞珠”	“红地球”
1	MS	2.0			0.5	0.05	100	100	100	0	0	0	0 g	0 f	0 f
2	MS		2.0		0.5	0.05	100	100	100	26 *	12 *	37 ■ *	26 e	12 e	37 d
3	MS			2.0	0.5	0.05	100	100	100	13 *	13 *	22 *	13 f	13 e	22 e
4	B5	2.0			0.5	0.05	100	100	100	0	0	0	0 g	0 f	0 f
5	B5		2.0		0.5	0.05	100	100	100	63	74 *	86 ■ *	63 c	74 c	86 b
6	B5			2.0	0.5	0.05	100	100	100	54	32 *	80 ■ *	54 d	32 d	80 c
7	GS	2.0			0.5	0.05	100	100	100	0	0	0	0 g	0 f	0 f
8	GS		2.0		0.5	0.05	100	100	100	81 ■ *	82 ■ *	85 ■	81 a	82 a	85 b
9	GS			2.0	0.5	0.05	100	100	100	67 ■	79 ■	88 ■ *	67 b	79 b	88 a

注: *: 第 1 类愈伤组织(非胚性愈伤组织); : 第 2 类愈伤组织(非胚性愈伤组织); ■: 第 3 类愈伤组织(胚性愈伤组织)。不同小写字母表示在 0.05 水平上差异显著,下同。

2.2 不同培养基对葡萄茎尖诱导愈伤组织的影响

以葡萄茎尖为外植体,在添加不同植物生长调节剂的 MS、B5、GS 3 种培养基上分别进行愈伤组织诱导。通过方差分析可知,培养基间、品种间差异显著。诱导培养 10 d 后,3 个品种在 B5 培养基中诱导效果最好,在添加 KT 2.0 mg/L+2,4-D 0.5 mg/L+NAA 0.05 mg/L 的 6 号 B5 培养基中诱导率高达 100%。与

6 号培养基同样的植物生长调节剂配比在 9 号 GS 基本培养基中也表现出高诱导率的优势,但在 MS 培养基中 3 个品种均未诱导出愈伤组织。其中,“霞多丽”、“红地球”2 个品种在 6 号培养基中诱导率都达到 100%,“赤霞珠”仅为 85%。“霞多丽”在 9 号培养基中诱导率最高为 90%,“红地球”为 85%,“赤霞珠”为 75%(表 2)。

表 2 不同培养基对葡萄茎尖诱导愈伤组织的影响

编号	培养基	植物生长调节剂/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$					茎尖数/个			愈组数/块			诱导率/%		
		TDZ	6-BA	KT	2,4-D	NAA	“霞多丽”	“赤霞珠”	“红地球”	“霞多丽”	“赤霞珠”	“红地球”	“霞多丽”	“赤霞珠”	“红地球”
1	MS	2.0			0.5	0.05	20	20	20	0	0	0	0 e	0 d	0 d
2	MS		2.0		0.5	0.05	20	20	20	0	0	0	0 e	0 d	0 d
3	MS			2.0	0.5	0.05	20	20	20	0	0	0	0 e	0 d	0 d
4	B5	2.0			0.5	0.05	20	20	20	0	0	0	0 e	0 d	0 d
5	B5		2.0		0.5	0.05	20	20	20	17	15	16	85 c	75 b	80 c
6	B5			2.0	0.5	0.05	20	20	20	20	17	20	100 a	85 a	100 a
7	GS	2.0			0.5	0.05	20	20	20	0	0	0	0 e	0 d	0 b
8	GS		2.0		0.5	0.05	20	20	20	9	11	16	45 d	55 c	80 c
9	GS			2.0	0.5	0.05	20	20	20	18	15	17	90 b	75 b	85 b

2.3 不同培养基对葡萄茎尖愈伤组织分化丛生芽的影响

“红地球”花药愈伤组织 46% 为 EC, 分化率仅为 30%。3 个品种茎尖诱导出的愈伤组织 90% 为 EC, EC 愈伤组织有较强的分生能力, 可产生再生植株(图 2)。

5 种分化培养基中, 2 号培养基 B5+KT 1.0 mg/L

表 3

不同培养基对葡萄茎尖愈伤组织分化丛生芽的影响

编号	培养基	植物生长调节剂/mg·L ⁻¹					愈组数/块			丛生芽数/丛			分化率/%		
		TDZ	6-BA	KT	IAA	NAA	“霞多丽”	“赤霞珠”	“红地球”	“霞多丽”	“赤霞珠”	“红地球”	“霞多丽”	“赤霞珠”	“红地球”
1	B5		1.0	0	0	0.6	15	12	14	10	8	14	66.7b	66.7b	100a
2	B5			1.0	0.5		15	12	14	15	10	14	100a	83.3a	100a
3	GS		1.0			0.6	15	12	14	7	5	11	46.7c	41.7c	78.6b
4	GS			1.0	0.5		14	12	14	6	8	9	42.9d	66.7b	64.3c
5	MS	1.0				0.2	14	11	13	4	3	8	28.6e	27.3d	61.5d

2.4 再生植株的生根

葡萄再生植株在 1/2MS+6-BA 0.2 mg/L+IBA 0.5 mg/L, 1/2MS+6-BA 0.2 mg/L+IAA 0.5 mg/L, 1/2MS+IBA 0.5 mg/L 3 种培养基中均能生根, 生根率 90% 左右, 根的数量 4~5 条, 差异不大。在分化培养基中也有少量植株生根, 但基部有少量愈伤组织产生, 说明 1/2MS 是较为理想的生根培养基。

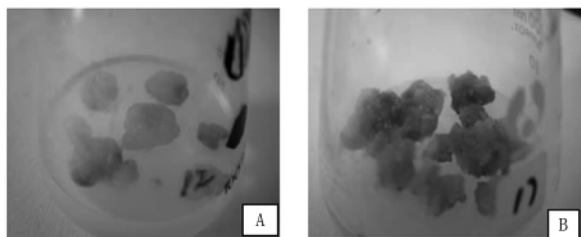


图 1 花药诱导的非胚性愈伤组织未分化出绿苗
注: A: 第 1 类愈伤组织; B: 第 2 类愈伤组。

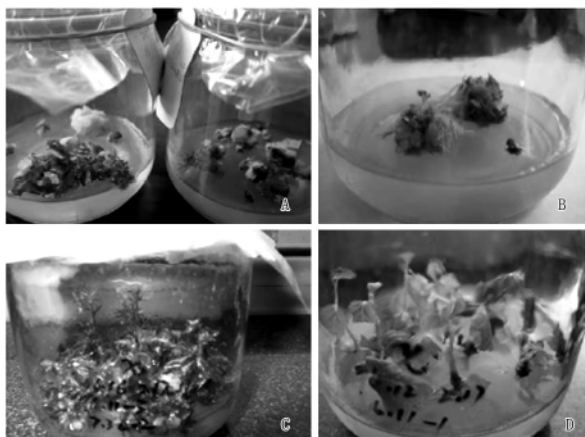


图 2 茎尖诱导的胚性愈伤组织分化丛生苗
注: A, B: 不定芽分化; C: 丛生芽; D: 增殖。

+IAA 0.5 mg/L 分化效果最好, 即在茎尖愈伤组织分化中 KT 与 IAA 组合较有利于丛生芽的形成, “霞多丽”和“红地球”分化率高达 100%。B5 是茎尖愈伤组织丛生芽分化的最适合培养基; KT 促进分化效果较 6-BA 好, TDZ 对茎尖愈伤组织丛生芽分化促进作用较弱(表 3)。

表 3

3 讨论

愈伤组织诱导的频率与外植体的组织类型和植物生长调节剂密切相关^[9-10]。选用合适外植体, 保障愈伤组织质量, 从而获得高再生率^[11]。该试验对宁夏 3 个葡萄品种的花药和茎尖进行愈伤组织诱导培养, 结果表明, “红地球”和“霞多丽”、“赤霞珠”花药极少或不形成 EC(颗粒状), 大部分为 NEC(糊状或粉状)。在诱导和继代过程中, NEC 生长速度快, 很难再被诱导转化为作为植株再生材料的 EC。上述现象在其它作物中同样存在^[12], 小部分 EC 在继代过程中逐渐褐化死亡。而茎尖能获得 45%~100% 的 CE, CE 分化效率高。茎尖可诱导出结构松散、颗粒状并可长期继代的愈伤组织^[13], 是建立葡萄脱毒再生体系的首选外植体。

B5 培养基广泛应用于葡萄组织培养中, 刘金亮等^[14]以刺葡萄愈伤组织为材料, 在 B5 培养基上研究了刺葡萄芽的诱导、增殖和生根培养。朱波等^[15]对山葡萄的研究结果表明, 山葡萄腋芽诱导以 B5 培养基为宜。白瑞兴等^[16]采用大量元素减半的 B5 培养基, 诱导单生芽和根生长, 从而形成完整植株的一次成苗培养法。该试验结果也证实 B5 培养基诱导宁夏葡萄茎尖愈伤组织和分化丛生芽效果最好。

植物激素是影响植物组织培养中愈伤组织、茎尖分化和生根关键因素之一, 具有刺激形成层细胞分裂、诱导愈伤组织和不定芽的形成等生理作用^[17-18]。张宝红等^[19]证明, 细胞分裂素(ZT)有利于棉花胚性愈伤组织的产生。胡松梅等^[20]从朝天罐愈伤组织的诱导来看, 6-BA 诱导效果优于 2,4-D。同时 6-BA 对植物的增殖效果显著^[21]。该试验研究表明, 2.0 mg/L KT 有利于葡萄茎尖胚性愈伤组织的诱导, 1.0 mg/L KT 有利于茎尖胚性愈伤组织的分化; 6-BA 的分化效果仅次于 KT。

生长点的长短是影响再生植株成活率和脱毒效果的关键环节。在一定的范围内茎尖分生组织越大,培养成苗的机率就越高^[22],1.0 mm左右的茎尖有利于培养和扩繁^[23]。该研究中,剥取的生长点长度在0.8~1.0 mm,既保证了茎尖成活率,又提高了愈伤组织的诱导率,为宁夏葡萄生产脱毒苗奠定了良好基础。

参考文献

- [1] 金万梅,董静,闫爱玲,等. 葡萄器官离体再生和遗传转化体系的建立[J]. 园艺学报,2008,35(1):27-32.
- [2] 杨晓明,安黎哲,王雅梅,等. 酿酒葡萄“神索”体胚发生及再生体系遗传稳定性分析[J]. 园艺学报,2006,33(6):1317-1320.
- [3] 曾建国,吴雪梅. 巨峰葡萄组培快繁过程中初代培养基的筛选[J]. 现代园艺,2010(7):4-7.
- [4] 吴伟民,袁骥,钱亚明,等. ‘宿晓’红葡萄单芽茎段组织培养研究[J]. 江苏农业科学,2007(5):98-100.
- [5] 张爱华,容新民,李玉国. 组织培养脱毒技术在新疆葡萄快繁中的应用[J]. 农业科技通讯,2008,(4):49-51.
- [6] 陈莉,窦秉德,罗玉明,等. 玉米茎尖培养再生体系的建立[J]. 淮阴师范学院学报(自然科学版),2006,5(1):64-68.
- [7] 张文娥,王飞,潘学军. 葡萄属植物(*Vitis* L.)再生系统的研究进展[J]. 西北农林科技大学学报,2003,31(10):191-196.
- [8] 廖文雪,石贵玉,韦颖,等. 刺葡萄愈伤组织的诱导和分化培养[J]. 南方园艺,2009,20(6):3-6.
- [9] Yuan S, Yan Y C, Lin H H. Plant regeneration through somatic embryogenesis from callus cultures of *Dioscorea zingiberensis* [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2005, 80:157-161.
- [10] 洪森荣,尹明华,邵兴华. 野葛叶片和茎段高频再生体系的建立[J]. 植物研究,2008,28(4):458-464,508.
- [11] 王世玉,郑用琰,刘亚,等. 玉米成熟胚胚性愈伤组织的诱导、高频再生及转化的研究[J]. 作物学报,2008,34(3):423-428.
- [12] Hoque M E, Ali M S, Karim N H. Embryo genic callus induction and regeneration of elite bangladeshi indica rice cultivars[J]. Plant Tissue Cult Biotech, 2007, 17(1):65-70.
- [13] 陆瑞菊,何婷,王亦菲,等. 糯玉米离体培养获取耐盐变异体[J]. 核农学报,2009,23(3):380-384.
- [14] 刘金亮,吕长平,石雪晖,等. 刺葡萄愈伤组织的分化、芽的增殖及生根培养[J]. 作物研究,2005,19(2):106-108.
- [15] 朱波,曹后男,朴日子,等. ‘左山一’山葡萄组织培养快速繁育体系的研究[J]. 延边大学学报,2005,27(1):1-5.
- [16] 白瑞兴,温豁然,李学峰,等. 葡萄组织培养一次成苗技术[J]. 北方果树,2009(2):15-16.
- [17] 吴金平,宋志红,杨朝柱,等. 魔芋茎尖组织培养及快速繁殖技术研究[J]. 长江蔬菜,2008(16):35-36.
- [18] 朱美虹,王浩宇. 草莓组培快繁技术[J]. 农村科技,2010(3):40-41.
- [19] 张宝红,李秀兰,李凤莲,等. 棉花优良新品种泗棉3号高频体细胞胚发生和植株再生的研究[J]. 西北农业学报,1995,4(4):11-16.
- [20] 胡松梅,禹华芳,龚泽修,等. 朝天罐的离体培养与植株再生[J]. 核农学报,2009,23(4):626-630.
- [21] 王树芝,田砚亭,李云. 四倍体刺槐无性系组织培养技术的研究[J]. 核农学报,2002,16(1):40-44.
- [22] 王碧琴,盖安俊. 紫色甘薯茎尖脱毒与快繁及试管苗移植技术研究[J]. 江西科学,2010,28(2):196-202.
- [23] 董伟清,闭志强,何铁光. 玉林大蒜茎尖脱毒与繁殖技术研究[J]. 广西农业科学,2009,40(10):1289-1291.

(该文作者还有李苗,工作单位宁夏农业生物技术重点实验室。)

High Efficient Regeneration System Establishment of Three Grape Cultivars in Ningxia

WANG Jing-dong^{1,2}, ZHANG Li^{1,2}, MA Hong-ai¹, CHEN Xiao-jun¹, GUAN Ya-jing¹, SONG Yu-xia^{1,2}, LI Miao¹

(1. Ningxia Key Laboratory for Agri-Biotechnology, Yinchuan, Ningxia 750002; 2. National Engineering Laboratory of Forest Tree Breeding, Beijing 100083)

Abstract: An high-efficient regeneration system of grape was established by use of three cultivars of Ningxia. By means of anther and step-tip callus induced, we compared the conditions for formation, differentiate and rhizogenesis of three cultivars callus. The adventitious bud differentiate regeneration plants was obtained. The results showed that the callus induced from anther of grape was produced low embryonic callus so as to no seeding regenerated, while that from stem-tip had produced high embryonic callus with differentiation rate as high as 100%. The differentiated plant produced in methods of stem-tips by callus culture was the best economic and efficient way for grape industry and development in Ningxia.

Key words: grape; anther; step-tip; differentiation; regeneration system