

“巨峰”葡萄热处理茎尖培养技术研究

曹冬煦¹, 周海峰², 于生成³, 年玉欣⁴

(1. 沈阳农业大学 生物科学技术学院, 辽宁 沈阳 110866; 2. 沈阳兰溪绿化技术开发有限公司, 辽宁 沈阳 110161;

3. 武警辽宁总队后勤部农副业生产基地, 辽宁 沈阳 110034; 4. 沈阳农业大学 林学院, 辽宁 沈阳 110866)

摘要:以“巨峰”葡萄为试材,经热处理后取其茎尖进行离体培养,通过调整激素的种类和浓度,筛选出了适宜“巨峰”葡萄茎尖分化和生根的培养基;通过对不同移栽基质的研究,筛选出了移栽成活率较高的基质配方。结果表明:38℃热处理时葡萄苗发芽率最高,可达86.67%;以GS为基本培养基,附加BA 0.5 mg/L与NAA 0.1 mg/L,最适宜于“巨峰”葡萄茎尖分化成苗,分化率可达70.00%;生根培养基以GS+IBA 0.06 mg/L的生根率最高。适宜“巨峰”葡萄茎尖组培苗移栽的基质为河沙1份+水苔1份。

关键词:“巨峰”葡萄;茎尖;组织培养

中图分类号:S 663.103.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2012)09-0116-03

葡萄(*Vitis vinifera*)为葡萄科(Vitaceae)葡萄属(Vitis)的落叶藤本植物,因其味道甜美、营养丰富而深受人们喜爱,是世界栽培面积最大、产量最高的浆果果树。目前已发现的葡萄病毒病达55种^[1],对葡萄的产量、质量以及葡萄的寿命都有很大的影响。自1952年Morel等^[2]从病毒感染的大丽花分生组织培养再生植株获得无病毒植株以来,茎尖培养常与获得无病毒苗结合进行。“巨峰”葡萄原产日本,是大井上康于1937年以‘石原早生’为母本、‘申田尼’为父本杂交培育得到的,为四倍体品种。我国于1959年引进,并在全国各地大面积推广,成为深受果农欢迎的主栽品种。但是由于病毒侵染,近年来“巨峰”葡萄的品质出现了下降,有的果实成熟不良,果粒大小参差不齐、着色较差,果肉硬而酸涩;有的果梗变褐、枯萎,葡萄腐烂变质,严重影响了鲜食“巨峰”葡萄的口感,给果农带来了较大的经济损失。我国从20世纪80年代开展了一系列葡萄组织培养方面的研究^[3]。该研究是在前人研究的基础上改进葡萄组培方法,探索“巨峰”葡萄茎尖培养技术,旨在为我国的葡萄脱毒研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验材料“巨峰”葡萄来自于沈阳农业大学葡萄园。

第一作者简介:曹冬煦(1979-),男,硕士,实验师,研究方向为遗传育种及组织培养。E-mail:13322475522@189.cn。

责任作者:年玉欣(1978-),女,硕士,讲师,研究方向为植物遗传育种与繁育。E-mail:nianyuxin3@126.com。

收稿日期:2011-02-06

1.2 试验方法

1.2.1 茎尖处理方法 处理1:选取健壮“巨峰”葡萄苗30株,栽在花盆中,灌足水,放到热处理室中进行热处理,处理温度为34℃,相对湿度为75%,待其长出新梢后,剪取直径为0.5 cm的新梢,用自来水冲洗、备用;处理2:选取健壮“巨峰”葡萄苗30株,栽在花盆中,灌足水,放置于温度为38℃,相对湿度80%的热处理室中,待其长出新梢后,剪取直径为0.5 cm的新梢,用自来水冲洗、备用。处理3:选取健壮“巨峰”葡萄苗30株,栽在花盆中,灌足水,放置于温度为42℃,相对湿度85%的热处理室中,待其长出新梢后,剪取直径为0.5 cm的新梢,用自来水冲洗以备使用。

1.2.2 分化培养基的筛选 在无菌条件下,将“巨峰”葡萄新枝用75%的酒精浸泡30 s,然后用0.1%的HgCl₂消毒5~10 min,用无菌水漂洗5次,于解剖镜下切取0.5 mm大小的茎尖,接种在分化培养基上进行诱导培养。培养温度控制在25℃,光照1 500 lx。分化培养基以GS培养基为基本培养基,分别附加一定浓度的BA、KT、NAA(培养基配方见表2),比较外源激素对茎尖的诱导分化效果,筛选适宜的分化培养基。分化率(%)=(形成不定芽的茎尖数/接种茎尖数)×100%。

1.2.3 生根培养基的筛选 将茎尖分化培养基中生长良好的“巨峰”葡萄分化苗转接到生根培养基中,进行单株生根成苗培养。培养条件同上。生根采用的基本培养基为GS培养基,分别附加一定浓度的NAA、IAA、IBA(培养基配方见表3),比较不同培养基中茎尖分化苗的生根率和平均每株生根条数等指标,筛选出最适合“巨峰”葡萄生根的培养基。生根率(%)=(生根茎尖

数/接种茎尖数)×100%。

1.2.4 组培苗移栽基质的筛选 以草炭、腐殖土、珍珠岩、河沙和水苔为原料,配制不同的移栽基质,将生根良好的“巨峰”葡萄茎尖组培苗去掉封口膜,置于自然散射光中,练苗7 d,然后从瓶中取出,用清水洗去附着在根部的培养基,移栽到不同配方的基质中(基质均经过消毒处理),罩上小拱棚,若是日光强烈还需附上遮阳网。每天通风2次,并适当喷水保持基质及拱棚湿度,温度控制在白天20~25℃;夜晚15~18℃。移栽基质配方如下:(1)草炭1份+腐殖土2份+河沙0.5份;(2)草炭2份+腐殖土1份+珍珠岩0.5份;(3)草炭3份+腐殖土0.5份;(4)河沙1份;(5)水苔1份;(6)河沙1份+水苔1份。调查试管苗在不同基质中的移栽成活率,筛选出移栽成活率最高的基质。

2 结果与分析

2.1 热处理温度对发芽率的影响

由表1可知,温度太高,热处理的“巨峰”葡萄苗成活率下降,其中以38℃时发芽率最高,可达86.67%。

表1 不同温度的热处理后“巨峰”葡萄苗的发芽率

Table 1 Germination rate of 'Kyoto' Grape after different heat treatment

编号 No.	株数 Quantity of seedling	温度 Temperature/℃	湿度 Humidity/%	发芽率 Germination rate/%
1	30	34	75	73.33
2	30	38	80	86.67
3	30	42	85	66.67

2.2 BA和KT浓度对“巨峰”葡萄分化效果的影响

在NAA浓度为0.1 mg/L的条件下,不同种类和浓度的细胞分裂素对“巨峰”葡萄茎尖的分化效果也明显不同。由表2可知,就总体情况而言,BA诱导葡萄茎尖分化的效果好于KT,其中以GS+BA 0.5 mg/L+NAA 0.1 mg/L的效果最好,分化率可达70.00%。该培养基可以选为“巨峰”葡萄分化培养的适宜培养基。

表2 “巨峰”葡萄茎尖在不同分化培养基中的分化率

Table 2 Differentiation rate of stem tip on different differentiation medium

培养基编号 No. of medium	激素浓度/mg·L ⁻¹			接种茎尖数 Quantity of stem tip/个	分化芽数 Quantity of differentiated bud/个	分化率 Differentiation rate/%
	BA	KT	NAA			
1	0.7		0.1	30	15	50.00
2	0.5		0.1	30	21	70.00
3	0.3		0.1	30	6	20.00
4		0.7	0.1	30	13	43.33
5		0.5	0.1	30	8	26.67
6		0.3	0.1	30	5	16.67

2.3 生长素对“巨峰”葡萄茎尖组培苗生根的影响

由表3可知,当分化2个月后的“巨峰”试管苗转接

到GS+IAA 0.10 mg/L的生根培养基中后,有90.00%的生根率,但平均生根数较低,仅为4.7条;在含有为0.06 mg/L的培养基中,生根率可达到93.33%,平均每株生根数为5.9;而NAA则可以使苗的根数有所增加,但生根率不高。综合生根率和平均生根数的2项指标,GS+IBA 0.06 mg/L IBA为较适宜的生根培养基。

表3 “巨峰”茎尖组培苗在不同培养基中的生根情况

Table 3 Condition of rooting on different rooting medium

培养基编号 No. of medium	激素种类 Category of hormone	激素浓度 Concentration of hormone /mg·L ⁻¹	接种株数 Quantity of seedling	生根株数 Quantity of rooted seedling	生根率 Rooting rate/%	平均生根数 Average quantity of root/条
1	NAA	0.02	30	18	60.00	3.4
2	IBA	0.03	30	20	66.67	2.6
3	IAA	0.06	30	17	56.67	3.3
4	NAA	0.04	30	24	80.00	6.2
5	IBA	0.06	30	28	93.33	5.9
6	IAA	0.10	30	27	90.00	4.7

2.4 移栽基质对“巨峰”葡萄组培苗成活的影响

由表4可知,生根苗在试管内练苗7 d以后,在河沙1份+水苔1份的移栽基质中成活率最高,为96.66%。主要原因是河沙和水苔的透气性较好,且对保水也起到了很好的作用,加之练苗的时间适宜,也能有效地增加移栽苗的成活率。

表4 “巨峰”葡萄组培苗在不同移栽基质中的成活情况

Table 4 Condition of survival on different transplanting substrate

移栽基质编号 No. of transplanting medium	株数 Quantity of seedling	练苗时间 Time for seedling adaptation/d	移栽后存活率 Survival rate after transplanting/%
1	30	7	90.00
2	30	7	86.67
3	30	7	80.00
4	30	7	86.67
5	30	7	73.33
6	30	7	96.67

3 讨论与结论

葡萄是可以扦插成活的果树,但由于病毒病的累积与蔓延,长期采用扦插方法进行繁殖,极易造成葡萄果实品质退化、产量降低。茎尖培养是利用植物组织培养技术,切取茎尖进行培养,因其携带病毒较少,可以在短时间内获得大量品质优良的脱毒再生植株,是“巨峰”葡萄脱毒快繁的重要途径,同时也是“巨峰”葡萄种质资源保存的主要方法之一,具有极大的推广应用价值^[4-5]。

该试验将热处理和茎尖培养结合运用于“巨峰”葡萄组培苗的培养,以期为今后的葡萄脱毒工作提供依据。顾佩雯^[6]、何家涛等^[7]的研究认为变温处理会有更好的脱毒效果,在后继的“巨峰”葡萄脱毒工作中是否适用还有待进一步研究。

国内学者在葡萄茎尖培养时多采用 MS 培养基和 B₅ 培养基,该试验采用了 GS 培养基获得了满意的效果,与 MS 培养基相比,GS 培养基中硝酸铵和氯化钙的含量较低,因此“巨峰”葡萄对这 2 种物质的利用机制还有待进一步研究。移栽基质的种类及各种材料的配比对组培苗的移栽成活至关重要,该试验用河沙 1 份+水苔 1 份进行移栽获得较好效果,诸如稻壳、蛭石、花生壳等也是不错的选择,在以后的试验中可以进一步尝试。

参考文献

[1] 王引权,古勤生,陈建军,等.葡萄病毒病研究进展[J].果树学报,2004,21(3):258-263.

[2] Morel C, Martin C. Guérison de dahlias atteints d'une maladie à virus [J]. C. R. Acad. Sci., 1952, 235: 1324-1325.

[3] 曹孜义,齐与枢,郭采月.葡萄试管快速繁殖[J].葡萄科技,1979(4):26-29.

[4] 黄学林,李筱菊.高等植物组织离体培养的形态建成及其调控[M].北京:科学出版社,1995:64-95.

[5] 桂耀林,马诚.植物组织培养[M].北京:科学出版社,1985:1-10.

[6] 顾佩雯.葡萄卷叶病毒的脱毒技术研究[J].西北农林科技大学学报(自然科学版),2008,36(5):85-91.

[7] 何家涛,赵劲松,董珍文.高茎葡萄茎尖脱毒技术与高效再生体系研究[J].广东农业科学,2007(4):39-42.

Study on Heat-treated Stem Tip Culture of Kyoho Grape

CAO Dong-xu¹, ZHOU Hai-feng², YU Sheng-cheng³, NIAN Yu-xin⁴

(1. College of Biological Science and Technology, Shenyang Agricultural University, Shenyang, Liaoning 110866; 2. Shenyang Lanxi Greening Technology Development Company Limited, Shenyang, Liaoning 110161; 3. Logistics Department Agriculture and Avocation Base of Liaoning Provincial Corps of CPAP, Shenyang Liaoning, 110034; 4. College of Forestry, Shenyang Agricultural University, Shenyang, Liaoning 110866)

Abstract: Kyoho grape was used as test material, stem tip was cultured after heat treatment, optimum medium formulas for multiple shoot differentiation from stem tip and for rooting were separately selected by adjusting the category and concentration of hormones, and optimum substrate for transplanting was also gained. The results indicated that the highest germination rate 86.67% was obtained by heat treatment at 38℃; GS+BA 0.5 mg/L+ NAA 0.1 mg/L was suitable for multiple shoot differentiation from stem tip, with the differentiation rate 70.00%, and GS+IBA 0.06 mg/L was optimum formula for rooting. The equivalence mixture of riversand and water moor was optimum substrate for transplanting.

Key words: 'Kyoho' grape; stem tip; tissue culture

葡萄采摘后要加强管理

1 **增施肥料** 生产实践表明,秋施基肥愈早愈好,一般情况下,每 667 m² 用土杂肥、圈肥、堆肥等有机肥 2 000 kg 加过磷酸钙 20 kg,混合后开沟施入,施后覆盖好浇透水。

2 **抑制枝蔓** 枝蔓的徒长,将消耗树体大量的养分,应采取摘心、抹除副梢等措施控制其生长,以减少养分的无效消耗,促使主蔓及被保留的副梢粗壮,芽体饱满充实。同时,还应对枝蔓进行合理的修剪,粗壮的枝多留,瘦弱的枝少留,过密枝、细弱枝、病虫枝应及早疏除。

3 **中耕松土** 秋季果园杂草丛生,土壤透气性差,因此,采果后及时中耕除草,并进行深翻,这样既有利于园内土壤疏松透气又可保水保肥,促进新根新梢生长。

4 **防病除病** 葡萄叶片易受霜霉病、白粉病、白腐病、褐斑病的危害。因此,葡萄果实采摘后可用 70% 甲基托布津可湿性粉剂 1 000 倍液等喷施,每隔 10 d 喷施 1 次。

5 **减少损伤** 有些地方葡萄采收后,大量剪除副梢和老叶,既影响当年枝条成熟,又易逼发冬芽,严重影响来年植株的生长和结果,一般采后不摘叶和少除梢,尽量保留健壮枝叶。同时,田间作业时防止机械损伤枝叶,保证枝蔓正常老熟。

6 **整理果园** 因采摘管理等操作频繁,土壤易被踏实,采果后应立即进行一次中耕松土,增加土壤的疏松透气性,促发新根。还要结合秋、冬季修剪,将果园内的枯枝落叶、病虫僵果彻底清除、集中销毁,降低病虫越冬基数,减轻翌年病虫的危害。