

“新郁”葡萄离体再生体系的建立

骆 萌¹, 王 杰¹, 李 玉 玲², 宋 士 任¹, 赵 丽 萍¹, 许 文 平¹

(1. 上海交通大学 农业与生物学院, 上海 200240; 2. 新疆维吾尔自治区葡萄瓜果研究所, 新疆 鄯善 838200)

摘 要:以“新郁”葡萄组培苗为试材,采用离体再生方法,探究了 IBA+6-BA 及 IBA+TDZ 2 种激素组合的 8 个浓度对比对“新郁”葡萄离体叶片、叶柄和茎段的愈伤组织诱导及再生的影响。此外,通过比较红光、白光、蓝光、暗培养转红光、暗培养转白光、暗培养转蓝光 6 种光照条件下愈伤组织的诱导效率及分化潜力,确定了最适宜“新郁”葡萄离体组织培养的光照条件。结果表明:“新郁”葡萄离体再生体系在以叶片为外植体时不定芽再生效率最高;在最适宜的外源激素组合 IBA 0.2 mg/mL+6-BA 2.0 mg/mL 诱导下,不定芽再生率可达 34.9%。6 种光照条件中,以暗培养 3 周后转红光培养不定芽再生效果最佳,再生率、平均再生芽数、愈伤组织超氧化物歧化酶(SOD)活性和干物质含量均高于其它光质。

关键词:“新郁”葡萄;再生;外植体;激素;光质

中图分类号:S 663.103.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2016)09-0109-05

新疆是我国主要的葡萄产区之一,葡萄栽培历史悠久,种质资源丰富。近年来在传统优势品种的基础上选育出“新郁”^[1]、“火州黑玉”^[2]等葡萄新品种,为当地果农带来了丰厚的经济效益。然而,这些由于干旱地区选育的葡萄品种栽植于我国南方弱光多雨的气候条件下时,通常会出现抗病性差、结果性能下降等现象,严重制约了品种的发展与推广。利用基因工程的方法对品种进行基因改良,增加品种的抗病性和耐弱光性,是从根本上改变品种特性的有效手段。而一个高效的离体再生体系的建立,是构建转基因技术体系的关键环节^[3]。目前,虽然国内外已有很多针对葡萄再生体系建立的研究,但是受葡萄基因型、激素处理、培养环境的影响,现有的再生体系不具备普适性^[4]。

现以新疆维吾尔自治区葡萄瓜果研究所选育的“新郁”葡萄为试材,从外植体类型、培养基激素配比、光照条件 3 个主要的影响因素入手,探究转化效率最高的“新郁”葡萄再生体系,旨在为后续遗传转化奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

“新郁”葡萄栽植于新疆维吾尔自治区葡萄瓜果研究所实验田,组培苗由新疆维吾尔自治区葡萄瓜果研究所葡萄课题组保存。

1.2 试验方法

试验于 2014 年 7 月在新疆维吾尔自治区葡萄瓜果研究所组培实验室进行。

1.2.1 初代的建立 采集无病虫害、生长良好的“新郁”葡萄嫩梢,去除叶片后剪成 1~2 cm 的带单芽的茎段。用自来水冲洗 2 h 后置于超净工作台上消毒。先用 70% 的酒精浸泡 30 s,无菌水冲洗 1 遍;再用 1.0% 次氯酸钠溶液浸泡,期间不停摇动,消毒 8 min;最后用无菌水冲洗 3 次。将消毒好的茎段剪出新切口,接种在 1/2MS 培养基上(IBA 0.35 mg/L、琼脂 4.5 g/L、蔗糖 20 g/L,调 pH 值至 5.8~6.0,下同),置于培养室中培养(培养室中光照强度为 3 000 lx,每日光照时长 10 h,下同)。

1.2.2 继代培养 待“新郁”葡萄初代苗株高约 10 cm 时,取含单芽的组培苗节间接种于 1/2MS 培养基上,置于培养室中培养。

1.2.3 叶片、叶柄、茎段外植体的获得 取继代培养 30~40 d 的“新郁”葡萄试管苗幼嫩叶片(保留约 0.1 cm 长的叶柄),剪掉叶缘,将叶片剪成长 0.5 cm×0.5 cm 左右的外植体;取同龄苗的叶柄和茎段,剪成长 0.5~1.0 cm 的外植体。

第一作者简介:骆萌(1991-),女,博士研究生,研究方向为果树水分生理。E-mail:luommeng@sjtu.edu.cn.

责任作者:许文平(1973-),男,博士,副研究员,硕士生导师,研究方向为果实品质生物学。E-mail:wp-xu@sjtu.edu.cn.

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31160381);上海市现代农业技术体系建设资助项目(沪农科产字(2015)第 7 号)。

收稿日期:2015-12-23

1.2.4 激素配比的设定 将叶片、叶柄、茎段外植体接种在 MS 培养基上,培养基分别添加 IBA+6-BA 及 IBA+TDZ 2 种激素组合的 8 种不同浓度配比(表 1)。

1.2.5 光照条件的设定 将叶片外植体接种在 MS 培养基上,分别在红光、白光、蓝光、暗培养转红光、暗培养转白光和暗培养转蓝光 6 种光照条件下培养 7 周,其中暗培养阶段为 3 周。

1.3 项目测定

1.3.1 不定芽再生效率的统计与计算 离体组织培养 7 周后,统计产生愈伤组织的外植体数、再生不定芽的外植体数及每个外植体上的不定芽个数,再计算再生效率相关指标。愈伤组织诱导率(%)=产生愈伤组织的外植体数/接种的外植体数 $\times 100$;不定芽再生率(%)=再生不定芽的外植体数/接种的外植体数 $\times 100$;每外植体平均再生芽数=外植体再生的总芽数/再生不定芽的外植体数。每处理设 3 次重复,每重复 5 瓶,每瓶外植体数不少于 10 个。

1.3.2 超氧化物歧化酶(SOD)活性的测定 取 0.2 g 愈伤组织放入研钵,加入石英砂、碳酸钙和 1.6 mL pH 7.8 的磷酸缓冲液后,于冰水浴下充分研磨。将研磨所得匀浆全部转移至离心管中,在 4℃ 下以 10 000 r/min 离心 20 min,上清液储存在 4℃ 冰箱,用于 SOD 活性测定,采用 BEAUCHAMP 等^[5] 的氮蓝四唑(NBT)光还原法,以抑制 NBT 光还原反应($\lambda=560$ nm)达 50%的酶量为 1 个酶活性单位,表示为 U/g。

表 1 不同激素组合处理对“新郁”葡萄外植体不定芽再生的影响

Table 1 Effect of different hormone combination on shoot regeneration of 'Xinyu' grapevine explant

	激素组合			愈伤组织诱导率			再生频率			平均再生芽数		
	Hormone combination/(mg·mL ⁻¹)			Callus induction frequency/%			Regeneration frequency/%			Shoots number per explant		
	IBA	6-BA	TDZ	叶片 Leaf	叶柄 Petiole	茎段 Stem	叶片 Leaf	叶柄 Petiole	茎段 Stem	叶片 Leaf	叶柄 Petiole	茎段 Stem
A	0.1	3.0	0.0	100	100	100	20.0bcd	18.1ab	3.3a	1.20	1.20	1.00
B	0.1	5.0	0.0	100	100	100	22.0bc	18.0ab	2.7a	1.27	1.27	1.00
C	0.2	2.0	0.0	100	100	100	34.9a	18.8a	2.8a	1.10	1.64	1.00
D	0.2	4.0	0.0	100	100	100	32.0ab	12.7bc	1.6a	1.06	1.30	1.00
E	0.1	0.0	0.5	100	100	100	4.0d	2.0d	1.0a	1.00	1.00	1.00
F	0.1	0.0	1.0	100	100	100	8.0cd	4.0cd	0.0a	1.00	1.00	0.00
G	0.2	0.0	0.5	100	100	100	4.0d	1.0d	1.3a	1.00	1.00	1.00
H	0.2	0.0	1.0	100	100	100	6.0d	5.0cd	1.7a	1.00	1.00	1.00

注:不同小写字母表示不同激素组合间在 $P\leq 0.05$ 水平下有显著差异。下同。

Note: Different lowercase letters mean significant difference between different hormone combinations at $P\leq 0.05$. The same below.

在 8 个不同激素组合中,以激素组合 C 培养的离体叶片和叶柄的不定芽再生率最高,以激素组合 A 培养的离体茎段的不定芽再生率最高。说明最适合“新郁”葡萄离体叶片和叶柄再生的激素配比为 IBA 0.2 mg/mL+6-BA 2.0 mg/mL,而最适合茎段再生的激素配比为 IBA 0.1 mg/mL+6-BA 3.0 mg/mL。

1.3.3 干物质含量的测定 每个处理取 10 片愈伤组织在 80℃ 烘箱中烘至恒重,称量。

1.4 数据分析

试验结果采用 SPSS 统计软件进行方差分析,显著水平 0.05。

2 结果与分析

2.1 不同激素组合对“新郁”葡萄叶片、叶柄、茎段不定芽再生的影响

由表 1 可知,以“新郁”葡萄叶片、叶柄和茎段为离体再生外植体时,不同浓度配比的激素组合 IBA+6-BA 及 IBA+TDZ 均可 100% 诱导愈伤组织产生。外植体为叶片和叶柄时,激素组合 IBA+6-BA 的不定芽再生率(叶片 20.0%~34.9%,叶柄 12.7%~18.8%)和平均再生芽数(叶片 1.06~1.27,叶柄 1.20~1.64)要显著高于激素组合 IBA+TDZ 的不定芽再生率(叶片 4.0%~8.0%,叶柄 1.0%~5.0%)和平均再生芽数(叶片 1.00,叶柄 1.00)。只有在以茎段为外植体时,8 个激素组合(A~H)间不定芽再生率和平均再生芽数没有显著差异,但激素组合 IBA+6-BA 的平均再生率(2.6%)和平均再生芽数(1.00 个)依然要高于激素组合 IBA+TDZ 的平均再生率(1.0%)和平均再生芽数(0.75 个)。说明激素组合 IBA+6-BA 比 IBA+TDZ 更适合诱导“新郁”葡萄叶片、叶柄和茎段的不定芽再生。

2.2 不同外植体类型对“新郁”葡萄不定芽再生的影响

由图 1 可知,无论是 8 个激素组合诱导后的最高不定芽再生率还是平均不定芽再生率,3 种外植体类型间均存在显著差异。叶片在激素组合 C 诱导下不定芽再生率最高,达 34.9%,各组合平均再生率为 16.4%;叶柄在激素组合 C 诱导下再生率最高,达 18.8%,各组合平

均再生率为 10.0%；而茎段的最高再生率仅为 3.3%，各组合平均再生率为 1.8%。由此可以看出，“新郁”葡萄离体再生体系最适宜的外植体是叶片，茎段因不定芽再生率较低，不适合作为“新郁”葡萄离体再生体系的外植体。

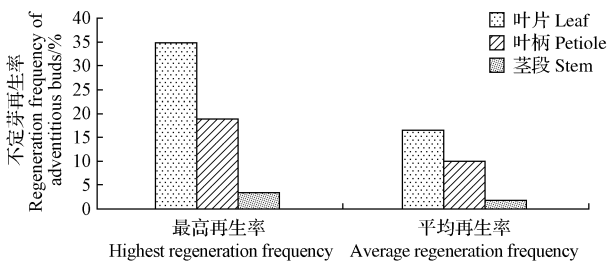


图 1 不同外植体类型对“新郁”葡萄外植体不定芽再生的影响
Fig. 1 Effect of different explant types on the shoot regeneration of ‘Xinyu’ grapevine explant

表 2 不同光质对“新郁”葡萄离体叶片不定芽再生的影响
Table 2 Effect of different light quality on shoot regeneration of ‘Xinyu’ grapevine leaves

光质 Light quality	再生频率 Regeneration frequency/ %		平均每株再生芽数 Average shoots number per explant	
	无暗培养 No dark culture	3 周暗培养 3-week dark culture	无暗培养 No dark culture	3 周暗培养 3-week dark culture
红光 Red light	38.28a	38.39a	1.00	1.00
白光 White light	17.10b	34.77a	1.00	1.00
蓝光 Blue light	0.00c	5.36b	0.00	1.00

2.4 愈伤组织超氧化物歧化酶(SOD)活性与干物质含量的测定

如图 2 所示,在不进行暗培养时,愈伤组织 SOD 活性在白光培养条件下最高而蓝光培养条件下最低;增加暗培养阶段后,各光照条件下愈伤组织 SOD 活性普遍升高,暗培养转红光条件下 SOD 活性达到 223.68 U/g,显著高于其它光质。说明增加暗培养阶段有利于提高 SOD 活性,从而增强愈伤组织的抗氧化能力。

不进行暗培养时,“新郁”葡萄愈伤组织的干物质含量按大小顺序为红光>白光>蓝光。增加暗培养阶段后,白光培养下干物质含量最大,为 0.47 g。经过对比,暗培养对“新郁”葡萄愈伤组织的干物质含量积累有促进作用,但提升效果并不显著。

总体来看,暗培养转红光条件下愈伤组织的 SOD 活性最高,干物质含量也基本与最高含量一致,说明暗培养转红光培养条件下的愈伤组织抗氧化能力强,干物质积累充裕,再生潜力最大。

3 讨论与结论

筛选最适宜的外植体类型和培养基激素条件是建

2.3 不同光质对“新郁”葡萄离体叶片不定芽再生的影响

由表 2 可以看出,不同光质对“新郁”葡萄离体叶片的再生效果有显著影响。在不进行暗培养时,红光最有利于不定芽的产生,接种叶片可以达到 38.28%的不定芽再生率;当培养采用白光时,不定芽再生率显著降低;而在蓝光培养条件下,则完全无法诱导不定芽的产生。

增加暗培养阶段后,3 种光质下离体叶片的不定芽再生率均有所提高。诱导效率最高的仍为红光,不定芽再生率为 38.39%。但白光的 不定芽再生率增幅最大,约为无暗培养阶段时的 2 倍。增加 3 周的暗培养阶段后,蓝光也能诱导不定芽的产生,但不定芽再生率仅为 5.30%,不适合用于“新郁”葡萄离体叶片的培养。

试验结果说明,暗培养阶段对诱导“新郁”葡萄离体叶片不定芽的产生有积极促进作用。增加暗培养阶段后,红光和白光培养条件下可达到 30%以上的不定芽的再生率,且 2 种光照条件间无显著差异。

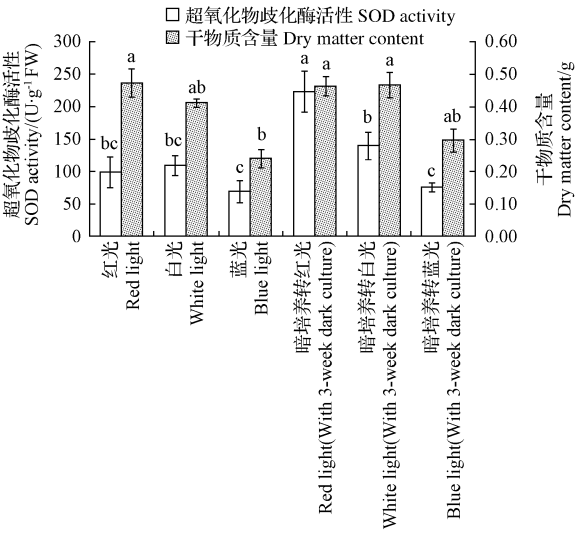


图 2 不同光照条件对“新郁”葡萄愈伤组织超氧化物歧化酶活性及干物质含量的影响
Fig. 2 Effect of different light quality on the activity of SOD and dry matter content of ‘Xinyu’ grapevine regeneration seedlings
立植物再生体系的关键任务,而选择合适的光质来进行组织培养,也能够提高不定芽的再生效果^[8]。

最适宜不定芽再生的外植体类型因葡萄基因型的不同而存在差异。彭少兵^[6]研究发现,外植体为叶片时,中国野生葡萄“白河-35-1”的不定芽再生率最高,诱导效果明显好于叶柄和茎段;余智莹等^[7]以“美人指”葡萄为试材,发现叶柄对不定芽的诱导效果最好,其次为叶片。此外,还有其它研究分别以叶片^[8]、叶柄^[9]和茎段^[10]得到了最佳的分化效果。说明每个葡萄品种再生体系的建立,都要有针对性的找到转化效率最高的外植体类型。该研究3种外植体的再生效率为叶片>叶柄>茎段,与彭少兵^[6]的研究结果一致。

培养基附加的外源激素会对葡萄离体器官的再生效率有显著影响。最重要的2类生长调节因子是细胞生长素和细胞分裂素^[11]。该研究根据JASKANI等^[12]、刘娜等^[13]的研究结果,以IBA作为再生体系中的细胞生长素,另外选择6-BA和TDZ 2种细胞分裂素来与之组合。结果表明,IBA+6-BA比IBA+TDZ的激素组合更有利于诱导“新郁”葡萄的植物离体组织产生不定芽。这与冯莎莎等^[14]在“巨峰”葡萄上的试验结果一致,但与张文娥等^[15]、房玉林等^[16]的研究结果相反。GRAY等^[17]研究发现,在使用TDZ作为细胞分裂素时,再生出的不定芽会发生扭曲,造成发育不良。该试验观察到了相似的现象,但具体原因尚不明确。此外,OLÁH等^[18]在对59个葡萄品种进行离体组织培养试验后指出,不同葡萄品种对生长调节剂的响应程度不同可能与该品种所属的种群有关。

离体组织培养采用的光照条件也会对不定芽再生率以及愈伤组织的生长状况产生影响。该研究发现光质诱导“新郁”葡萄不定芽再生效果的强弱顺序为红光>白光>蓝光。这一结果与在辣椒^[19]、甘蔗^[20]、一品红^[21]等作物上的研究结论一致。另外,前人研究表明^[22-23],在培养初始阶段增加暗培养会显著提升诱导效果。该研究验证了这一结论,并且发现增加暗培养对白光培养下的不定芽再生率提高最为显著。由于SOD活性能够反映植物体内活性氧的代谢情况^[24],而干物质含量能反映出植物体内有机物、营养元素的积累水平,因此这2个指标可以反映愈伤组织的生长状况。该研究发现,暗培养3周后转红光培养的愈伤组织SOD活性最高,干物质含量最大,最具分化潜力。这与庄智敏等^[9]的研究结果一致。

该研究成功得到了以“新郁”葡萄叶片为外植体,培养基附加激素组合IBA 0.2 mg/mL+6-BA 2.0 mg/mL的高效离体再生体系。诱导离体叶片不定芽再生时先经过3周暗培养再转红光培养4周,不定芽再生率可达

38.4%,愈伤组织SOD活性和干物质含量也高于其它光质。

参考文献

- [1] 骆强伟,孙锋,蔡军社,等. 葡萄新品种‘新郁’[J]. 园艺学报,2007,34(3):797.
- [2] 王勇,苏来曼,艾则孜,等. ‘火州黑玉’葡萄杂交后代果实性状遗传倾向分析[J]. 西北植物学报,2015,35(2):275-281.
- [3] 马远,杨玉洁. 葡萄组织培养应用研究进展[J]. 中外葡萄与葡萄酒,2002(4):23-26.
- [4] PÉROS J P, TORREGROSA L, BERGER G. Variability among *Vitis vinifera* cultivars in micropropagation, organogenesis and antibiotic sensitivity [J]. Journal of Experimental Botany, 1998, 49(319): 171-179.
- [5] BEAUCHAMP C, FRIDOVICH I. Superoxide dismutase; improved assays and an assay applicable to acrylamide gels [J]. Analytical Biochemistry, 1971, 44(1): 276-287.
- [6] 彭少兵. 中国野生葡萄再生体系研究及抗病相关基因 (*VpGLOX*, *VpPR17*, *VpHsf1*) 的克隆与功能分析[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2012.
- [7] 余智莹, 张平, 任俊鹏, 等. 美人指葡萄再生体系的建立[J]. 江西农业学报, 2011, 23(5): 44-49.
- [8] 李云, 冯慧, 田砚亭. “红地球”葡萄叶片, 叶柄不定芽再生体系的建立[J]. 园艺学报, 2002, 29(1): 60-62.
- [9] 庄智敏, 陶建敏, 李金凤, 等. 葡萄砧木 99R 再生体系的建立[J]. 江苏农业科学, 2006(6): 211-216.
- [10] 陶建敏, 庄智敏, 章镇, 等. 美人指葡萄不定芽离体诱导再生植株的研究[J]. 果树学报, 2005, 22(5): 551-553.
- [11] TORREGROSA L, BOUQUET A, GOUSSARD P G. *In vitro* culture and propagation of grapevine [M] // Molecular Biology & Biotechnology of the Grapevine. Springer Netherlands, 2001: 281-326.
- [12] JASKANI M J, ABBAS H, KHAN M M, et al. Effect of growth hormones on micropropagation of *Vitis vinifera* L. cv. perlette [J]. Pakistan Journal of Botany, 2008, 40(1): 105-109.
- [13] 刘娜, 许轲, 张文, 等. 四个酿酒葡萄品种组培快繁体系的初建[J]. 植物生理学报, 2013, 49(10): 1071-1076.
- [14] 冯莎莎, 刘守义. 巨峰葡萄外植体愈伤组织的诱导和植株再生[J]. 河北北方学院学报(自然科学版), 2008, 24(6): 45-48.
- [15] 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(自然科学版), 2004, 31(B10): 191-196.
- [16] 房玉林, 刘东, 宋士任. 圆叶葡萄 ‘Alachua’ 叶柄再生体系的建立[J]. 西北植物学报, 2007, 27(9): 1777-1781.
- [17] GRAY D J, BENTON C M. *In vitro* micropropagation and plant establishment of muscadine grape cultivars (*Vitis rotundifolia*) [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1991, 27(1): 7-14.
- [18] OLÁH R, ZOK A, PEDRYC A, et al. Somatic embryogenesis in a broad spectrum of grape genotypes [J]. Scientia Horticulturae, 2009, 120(1): 134-137.
- [19] 黄丽华, 洪亚辉, 戴雄泽, 等. 光质对辣椒离体愈伤组织诱导及分化的影响[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2009, 35(6): 615-617.
- [20] 梁钾贤, 陈彪. 光质对甘蔗愈伤组织分化出苗的影响[J]. 中国糖料, 2006(3): 9-11.

[21] 焦海华,铁军.不同光质对一品红幼茎愈伤组织的诱导和器官分化影响的研究[J].内蒙古师范大学学报(自然科学版),2003,32(2):168-170.
[22] 师校欣,杜国强,贺柱,等.外植体及培养条件对葡萄不定芽再生的影响[J].果树学报,2008,25(4):585-588.

[23] 王焯,顾兴芳,张圣平.暗培养对黄瓜子叶节再生频率及其相关酶活性和可溶性蛋白含量的影响[J].西北植物学报,2011,31(9):1793-1798.
[24] 卢爱华.丽格海棠离体再生过程中酶活性及激素含量的变化[D].广州:暨南大学,2009.

Establishment of Regeneration System of 'Xinyu' Grapevine *in vitro*

LUO Meng¹, WANG Jie¹, LI Yuling², SONG Shiren¹, ZHAO Liping¹, XU Wenping¹

(1. School of Agriculture and Biology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240; 2. Grape and Melons Research Institute of Xinjiang Uygur Autonomous Region, Shanshan, Xinjiang 838200)

Abstract: Taking 'Xinyu' grapevine as test material, using regeneration *in vitro* method, the effect of hormone combination IBA+6-BA and IBA+TDZ on callus induction and adventitious bud regeneration of leaves, petioles, and stem was studied. In addition, the inducing efficiency and differentiation potential of callus had been evaluated under six light conditions (red light, white light, blue light, red light after dark culture, white light after dark culture, blue light after dark culture) to find the most suitable light condition for the *in vitro* regeneration system of 'Xinyu' grapevine. The results showed that leaves should be used as explants for the regeneration of 'Xinyu' grapevine. The most suitable hormone combination was IBA 0.2 mg/mL+6-BA 2.0 mg/mL, while the most suitable light quality was red light (with 3-week dark culture).

Keywords: 'Xinyu' grapevine; regeneration; explant; hormone; light quality

欢迎订阅 2016 年《北方园艺》

中文核心期刊
中国农业核心期刊
全国优秀农业期刊
中国北方优秀期刊
黑龙江省优秀科技期刊
美国化学文摘社(CAS)收录期刊

主管:黑龙江省农业科学院
主办:黑龙江省农业科学院、黑龙江省园艺学会
中国标准连续出版物号:
ISSN 1001-0009 CN 23-1247/S
广告经营许可证号:2301070000009
邮发代号:14-150 半月刊 每月 15、30 日出版
单价:15.00 元 全年:360.00 元

全国各地邮局均可订阅 或直接向编辑部汇款订阅

本刊栏目涵盖园艺学的蔬菜、果树、瓜类、花卉、植保等研究领域的新成果、新技术、新品种、新经验。竭诚欢迎全国各地科研院所人员、大专院校师生,各省、市、县、乡、镇农业技术推广人员、农民科技示范户等踊跃订阅。

现辟有试验研究、研究简报、设施园艺、栽培技术、园林花卉、生物技术、植物保护、贮藏保鲜加工、食用菌、中草药、资源与环境、新品种选育、产业论坛、专题综述、农业经纬、经验交流等栏目。

地址:黑龙江省哈尔滨市南岗区学府路 368 号《北方园艺》编辑部

邮编:150086 电话:0451-86674276 信箱:bfiybjb@163.com 网址:www.haasep.cn