

DOI:10.11937/bfyy.201613027

# “赤霞珠”葡萄组培快繁体系研究

冯文华, 代红军

(宁夏大学 农学院, 宁夏 银川 750021)

**摘 要:**以“赤霞珠”葡萄为试材,对组培快繁中的取材部位、消毒方法、不同激素用量、是否带叶继代培养等关键技术措施进行了研究探讨。结果表明:以半木质化,0.1%升汞溶液消毒 8 min 的茎段接种,成活率高,污染率低;并且继代培养和生根培养最好的培养基为 1/2MS+IBA 0.2 mg·L<sup>-1</sup>+蔗糖 20 g·L<sup>-1</sup>+琼脂 7 g·L<sup>-1</sup>。

**关键词:**“赤霞珠”葡萄;组织培养;外植体

**中图分类号:**S 663.103.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2016)13-0104-03

酿酒葡萄品种的单一与苗木质量参差不齐成为限制我国葡萄酒产业发展的主要因素<sup>[1-2]</sup>。葡萄品种的苗木繁殖大多采用扦插和嫁接方法,受母株及砧木的限制,繁殖数量有限,育苗周期长且易于传播病害<sup>[3-5]</sup>。组培繁殖可利用较少的外植体,在短期内快速繁殖优质苗木而不受到季节的限制<sup>[6-8]</sup>。因此,建立高效酿酒葡萄品种组培快繁体系,可满足优质苗木商业化生产的需求,也为酿酒葡萄品种的遗传转化体系建设提供了试验数据。

现以酿酒葡萄品种“赤霞珠”为试材,通过探索无菌外植体接种、启动培养、增殖培养和生根培养环节的关键技术,初步建立酿酒葡萄组培快繁体系,以期酿酒葡萄新品种的规模化生产提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试材料为田间生长的“赤霞珠”葡萄植株。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 外植体消毒及启动培养** 在晴朗的上午选取生长旺盛的“赤霞珠”葡萄新梢,分别剪取幼嫩的梢端、木质化和半木质化的茎段为外植体,带回实验室用纱布包裹于水龙头下冲水一夜,剪为单芽茎段放在盛有蒸馏水的烧杯中,放入 4℃ 冰箱 1 h(利于芽的萌发)。在超净台内进行表面消毒。消毒过程为:75%酒精消毒 60 s、无菌水冲洗 1~2 次、0.1%升汞溶液消毒 8 min,或者 5%

次氯酸钠消毒 5 min,再用无菌水冲洗 4~5 遍,剪去两端接触药液的部分,最后用灭菌的滤纸吸去茎段表面的多余水分,分别接种于 MS 培养基上,于光照强度 30~40 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>,光照时间 14 h·d<sup>-1</sup>下培养,组培室温度为(25±2)℃。培养基中均加入蔗糖 30 g·L<sup>-1</sup>、琼脂 7 g·L<sup>-1</sup>,pH 5.8。14 d 后统计茎段生长状况和萌芽率。

**1.2.2 增殖培养** 外植体接种 25~28 d 后,单芽萌发生长至长度为 5~6 cm 时,继代培养。剪切萌发的新梢,去除大叶片后剪成单芽茎段(长 10~15 mm),每瓶接种 3 个茎段。选用 5 种处理作为增殖培养基:F1(1/2MS+IBA 0.2 mg·L<sup>-1</sup>+KT 1.0 mg·L<sup>-1</sup>+蔗糖 30 g·L<sup>-1</sup>)、F2(MS+6-BA 0.5 mg·L<sup>-1</sup>+IBA 0.2 mg·L<sup>-1</sup>+蔗糖 30 g·L<sup>-1</sup>)、F3(1/2MS+IBA 0.2 mg·L<sup>-1</sup>+6-BA 0.5 mg·L<sup>-1</sup>+蔗糖 30 g·L<sup>-1</sup>)、F4(1/2MS+IBA 0.2 mg·L<sup>-1</sup>+6-BA 0.5 mg·L<sup>-1</sup>+蔗糖 20 g·L<sup>-1</sup>)、F5(1/2MS+IBA 0.2 mg·L<sup>-1</sup>+蔗糖 20 g·L<sup>-1</sup>)。5 种培养基均加入琼脂 7 g·L<sup>-1</sup>(pH 5.8)。筛选适宜的葡萄增殖培养基。继代培养时,剪切萌发的新梢,留有叶片,将带叶片的茎段(长 10~15 mm)接入 F5(1/2MS+IBA 0.2 mg·L<sup>-1</sup>+蔗糖 20 g·L<sup>-1</sup>+琼脂 7 g·L<sup>-1</sup>)培养基中进行增殖培养,每瓶接种 2 个茎段;剪切萌发的新梢,去除叶片,并且将不带叶片的单芽茎段(长 10~15 mm)也接入 F5(1/2MS+IBA 0.2 mg·L<sup>-1</sup>+蔗糖 20 g·L<sup>-1</sup>+琼脂 7 g·L<sup>-1</sup>)培养基中进行增殖培养,每瓶接种 2 个茎段;30 d 后观察统计组培苗生长发育情况。

**1.2.3 生根培养** 选用增殖培养过程中生长健壮的一组培苗,剪切长度在 1.5~2.5 cm 并含有顶端生长点的新梢,接种在新的培养基(1/2MS+IBA 0.2 mg·L<sup>-1</sup>+蔗

**第一作者简介:**冯文华(1991-),女,硕士研究生,研究方向为葡萄栽培学。E-mail:415369173@qq.com.

**责任作者:**代红军(1967-),女,博士,教授,现主要从事葡萄栽培与生理等研究工作。E-mail:dai-hj@nxu.edu.cn.

**基金项目:**国家自然科学基金资助项目(31260456)。

**收稿日期:**2016-02-14

糖 20 g · L<sup>-1</sup> + 琼脂 7 g · L<sup>-1</sup> (pH 5.8) 中, 进行壮苗和生根培养。

2 结果与分析

2.1 不同取材部位的外植体的成活率

从表 1 可以看出, 以半木质化茎段接种成活率最

高, 为 96.5%, 且萌芽所需时间最短, 为 4~7 d。幼嫩新梢的外植体接种后大部分褐化死亡, 接种成活率次之, 为 18.0%, 萌芽所需时间为 14 d。木质化的外植体接种后污染严重, 接种成活率最低, 为 4.0%, 且萌芽所需时间最长, 为 20 d。

表 1 不同取材部位对茎段成活率的影响

Table 1 Effect of different sampling sites on the survival rate of stem segments

	接种茎段数 Number of inoculated stems/个	30 d 后萌发数 Germination number after 30 d/个	萌芽率 Germination rate/%	生长情况 Growth situation
幼嫩梢端 Tender tip	44	8	18.0	萌芽时间较慢, 褐化严重
半木质化 Semi-lignify	58	56	96.5	萌芽快, 成活率高
木质化 Lignification	47	2	4.0	萌芽慢, 污染率高, 成活率低

2.2 不同消毒方法对外植体成活率的影响

由表 2 可知, 以 0.1% 升汞溶液消毒外植体 8 min, 接种后外植体的污染率低, 为 3.8%。以 5% 次氯酸钠溶

液消毒外植体 5 min, 接种后外植体的污染率高, 为 92.1%。

表 2 不同消毒方法对茎段的影响

Table 2 Effect of different disinfection methods on the stem segment

	接种茎段数 Number of inoculated stems/个	污染数 Pollution number /个	污染率 Pollution rate /%	褐化数 Browning number /个	褐化率 Browning rate /%	生长状况 Growth situation
0.1% 升汞 0.1% Mercuric chloride	80	3	3.8	2	2.5	成活率高, 污染率低, 生长良好
5% 次氯酸钠 5% Sodium hypochlorite	76	70	92.1	3	3.9	成活率低, 污染率高, 生长差

注: 污染数与褐化数均是接种 30 d 后统计。

Note: The number of pollution and browning were 30 d after inoculation.

2.3 继代培养扩繁情况

“赤霞珠”葡萄分别在 F1、F2、F3、F4、F5 培养基上继代培养。从表 3 可以看出, F1、F2 培养基的组培苗生长矮小且生根较慢, 且 F1 培养基不定芽生长的较多。F3、

F4 培养基的组培苗均生成愈伤组织, 无不定根的生成。F5 培养基的组培苗生长健壮, 培养 20 d 后生根, 生根快且多又长, 有须根生成。每 50 d 剪切单芽茎段继代培养 1 次。

表 3 不同培养基对组培苗的影响

Table 3 Effect of different medium on tissue culture seedling

培养基 Culture medium	株数 The number/个	苗高 Seedling height/cm	生根率 Rooting rate/%	平均根数 Average root number/条	根长 Root length/cm	生长情况 Growth situation
F1	24	3.6	45.3	2	2.3	不定芽生长多, 植株生长矮小, 生根较慢
F2	24	2.2	13.0	2	2.5	植株生长矮小, 生根较慢
F3	24	2.2	0	0	0	植株生长矮小, 无根生长, 全部生成愈伤组织
F4	24	2.1	0	0	0	植株生长矮小, 无根生长, 全部生成愈伤组织
F5	24	5.2	100.0	8	15.4	植株生长健壮, 生根快且多又长, 有须根生成

注: 表中生长情况均是接种 30 d 后统计的。

Note: The growth in the table are 30 d after inoculation of the statistics.

2.4 带叶接种对组培苗的生长发育影响

表 4 表明, 带叶接种, 植株萌芽快, 生根率高, 植株平均根数多, 成苗率达 88.9%, 因此, 组培苗的带叶接种对加快繁殖速度、提高繁殖系数、节约时间等具有重要意义。

2.5 “赤霞珠”葡萄的生根生长

选取生长健壮的茎段, 含 1~2 个芽, 接种在生根培养基上: 1/2MS + IBA 0.2 mg · L<sup>-1</sup> + 蔗糖 20 g · L<sup>-1</sup>, 进行生根壮苗, 30 d 后植株均有根生成, 并且生根数多, 植株萌芽快, 叶片大而绿。

表 4 带叶接种对组培苗生长发育的影响

Table 4 Effect of leaf inoculation on the growth and development of tissue culture seedlings

	接种数 Inoculation number/个	接种 30 d 后 30 days after inoculation			
		生根率 Rooting rate/%	生根数 Rooting number/个	成苗数 Seedling number/个	成苗率 Seedling rate/%
带叶 With leaves	27	100	5	24	88.9
不带叶 Without leaves	21	45	2	11	52.4

### 3 讨论与结论

葡萄组培过程包括外植体接种、继代增殖培养、生根诱导和驯化移栽 4 个环节<sup>[9]</sup>,每个环节都非常重要,做好前期的培养工作对葡萄组织繁殖能否成功具有重要意义。该研究通过选用葡萄新梢不同部位(幼嫩的梢端、木质化和半木质化的茎段)为外植体,进行消毒接种,发现以葡萄新梢的半木质化茎段作为外植体材料,接种培养污染率低,外植体萌芽率高,是葡萄组培的理想外植体。表面消毒剂选用 75%酒精搭配 0.1%升汞溶液消毒效果最好。

启动培养和继代增殖培养是葡萄组培苗快速繁殖的关键阶段,该研究以 MS 为启动培养基,外植体萌芽快,成活率高。以添加 IBA 0.2 mg · L<sup>-1</sup> 和蔗糖 20 g · L<sup>-1</sup> 的 1/2MS 培养基为葡萄的继代增殖和生根培养基,既可扩繁殖又可生根壮苗。组培苗的新梢生长健壮,根系发达,成活率高。添加 6-BA 0.5 mg · L<sup>-1</sup>、KT 1.0 mg · L<sup>-1</sup> 和 IBA 0.2 mg · L<sup>-1</sup> 的 1/2MS 培养基中,组培苗不定芽发生数量多,但生长弱,且不易诱导生根,可能与培养基中盐离子浓度高与外源激素类物质配比不适宜有关<sup>[10-11]</sup>。KT 与 6-BA 对组培苗的生长发育效果不理想,这与前人的研究结果不相符合<sup>[12-14]</sup>,可能与 KT、6-BA 浓度、激素类物质配比和品种基因型差异有关。

该研究以酿酒品种“赤霞珠”半木质化茎段为外植体,接种成活率高。启动培养以 MS 基本培养基中的茎段萌芽率高。添加 IBA 0.2 mg · L<sup>-1</sup> 和蔗糖 20 g · L<sup>-1</sup> 的 1/2MS 培养基可以用于茎段增殖培养和生根壮苗,且以带叶茎段接种萌芽率高。酿酒葡萄品种组培快繁体系的初步建立,为酿酒葡萄品种苗木繁殖的商业化生产提供依据。

### 参考文献

- [1] 刘世松. 中国葡萄酒产业面临的危机与对策[J]. 酿酒, 2011, 38(5): 80-83.
- [2] 刘世松. 进口葡萄酒对我国葡萄酒产业的影响及对策[J]. 中国市场, 2011(45): 157-163.
- [3] 张发维, 罗会贤, 李晓松, 等. 优质果苗的繁殖技术总结[J]. 中国园艺文摘, 2011, 27(10): 152-155.
- [4] GARCÍA-GONZÁLES R, QUIROZ K, CARRASCO B, et al. Plant tissue culture: current status, opportunities and challenges[J]. Cienc Inv Agr, 2010, 37(3): 5-30.
- [5] DIAB A A, KHALIL S M, ISMAIL R M. Regeneration and micropropagation of grapevine(*Vitis vinifera* L.) through shoot tips and axillary buds[J]. IJABR, 2011, 2(4): 484-491.
- [6] STAMP J A, COLBY S M, MEREDITH C P. Direct shoot organogenesis and plant regeneration from leaves of grape(*Vitis* spp.)[J]. Plant Cell Tiss Org Cult, 1990, 22: 127-133.
- [7] TORREGROSA L, BOUQUET A. Adventitious bud formation and shoot development from *in vitro* leaves of *Vitis* × *Muscadinia* hybrids[J]. Plant Cell Tiss Org Cult, 1996, 45: 245-252.
- [8] HELOIR M C, FOURNIOUX J C, OZIOL L, et al. An improved procedure for the propagation *in vitro* of grapevine(*Vitis vinifera* cv. Pinot noir) using axillary-bud microcuttings[J]. Plant Cell Tiss Org Cult, 1997, 49: 223-225.
- [9] CHUONG P V, BEVERSDORF W D. High frequency embryogenesis through isolated microspore culture in *Brassica napus* L. and *B. carinata* braun[J]. Plant Sci, 1985, 39(3): 219-226.
- [10] 李永辉, 白远国, 邓红云, 等. 不同浓度 6-BA 对“红标无核”葡萄茎段培养的影响[J]. 安徽农业科学, 2007, 35(15): 4452-4453.
- [11] 周恒, 万召娣, 罗静. 紫秋刺葡萄离体繁殖研究初报[J]. 贵州农业科学, 2010, 38(9): 22-25.
- [12] GRAY D J, BENTON C M. Micropropagation and plant establishment of muscadine grape[J]. Proc Fla State Hort Soc, 1990, 103: 300-302.
- [13] GRAY D J, BENTON C M. *In vitro* micropropagation and plant establishment of muscadine grape cultivars(*Vitis rotundifolia*) [J]. Plant Cell Tiss Org Cult, 1991, 27: 7-14.
- [14] JASKANI M J, ABBAS H, SULTANA R, et al. Effect of growth hormones on micropropagation of *Vitis vinifera* L. cv. Perlette[J]. Pak J Bot, 2008, 40(1): 105-109.

## Study on Tissue Culture and Rapid Propagation System of ‘Cabernet Sauvignon’ Grape

FENG Wenhua, DAI Hongjun

(College of Agronomy, Ningxia University, Yinchuan, Ningxia 750021)

**Abstract:** Taking ‘Cabernet Sauvignon’ grape as test material, on the tissue culture and rapid propagation of sampling location, disinfection methods, different hormone dosage, leaves subculture of key technical measures were discussed. The results showed that the semi lignified, 0.1% HgCl<sub>2</sub> disinfection solution for 8 min of stems were inoculated, the survival rate was high, low pollution rate; and subculture and rooting culture medium for the best was 1/2MS+IBA 0.2 mg · L<sup>-1</sup> sucrose 20 g · L<sup>-1</sup> + agar 7 g · L<sup>-1</sup>.

**Keywords:** ‘Cabernet Sauvignon’ grape; tissue culture; explant