

不同倍性葡萄品种的快繁效率差异分析

乔海雨, 项晓冬, 任根增, 崔江慧, 常金华

(河北农业大学 农学院, 河北 保定 071001)

摘要:以四倍体“玫瑰香”、四倍体“巨玫”、二倍体“玫瑰香”3种不同倍性的葡萄品种为试材,采用组培快繁技术,研究了采样时间、启动继代培养、生根诱导、练苗移栽等过程对快繁效率的影响,以期为优良葡萄品种的快速繁殖提供参考依据。结果表明:最适田间取样时间为5月中旬,诱导和继代最适培养基分别如下。改良MS+6-BA $1.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$;改良MS+6-BA $1.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ +KT $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,在相同培养条件下,四倍体“玫瑰香”和四倍体“巨玫”不定芽增殖倍数高于二倍体“玫瑰香”,在生根培养过程中二倍体“玫瑰香”表现出优于四倍体“玫瑰香”及四倍体“巨玫”的生根能力,最适生根培养基分别为1/2MS+NAA $0.30 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、1/2MS+IAA $0.50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和1/2MS+IBA $0.10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,练苗最适基质为蛭石:泥炭(1:1)的混合基质,成活率可达90%以上。

关键词:葡萄;快速再生;茎尖培养

中图分类号:S 663.103.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2017)19-0029-06

葡萄属葡萄科(Vitaceae)葡萄属(*Vitis*)多年生藤本植物,栽培历史悠久,品种丰富,为世界第二大水果^[1-2]。因其果实营养丰富,酸甜可口,被广泛用于酿酒、鲜食以及加工制作成葡萄干、葡萄汁等食物。由于葡萄属多年生无性繁殖,其遗传背景复杂,传统育种周期长,培育新品种较为困难,且长期扦插会造成品种退化、病毒病频发等诸多问题,利用组织培养和遗传转化繁育优良新品种一直是葡萄育种研究的重点^[3-4]。多年来,有关葡萄属离体再生的报道较多^[5],但不同基因型葡萄品种离体再生过程差别较大^[6],该试验选用河北农业大学作物遗传育种实验室通过人工诱变得到四倍体“玫瑰香”葡萄及其与“巨峰”葡萄杂交选育后的新品种“巨玫”葡萄和二倍体“玫瑰香”作为

试验材料,从采样时间、外植体类型、基本培养基成分、植物生长调节剂配比等,研究建立“巨玫”快繁体系并分析不同倍性之间的快繁效率间的差异,以期为不同品种或多倍体品种的快速繁殖提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验于2015年5月10日、6月15日、8月20日从河北省保定市河北农业大学葡萄母本园选取四倍体“玫瑰香”、二倍体“玫瑰香”、四倍体“巨玫”生长旺盛的葡萄新蔓,分别剪取幼嫩的梢端、半木质化的带芽茎段为外植体,插入提前备有无菌水的广口瓶中带回实验室备用。

1.2 试验方法

1.2.1 样品处理

将采回的嫩梢及茎段进行修剪并用清水冲洗30 min,沥干水分后在超净工作台进行消毒。70%酒精消毒20 s、无菌水冲洗1~2次,茎尖再

第一作者简介:乔海雨(1989-),男,硕士研究生,研究方向为作物遗传育种。E-mail:912931958@qq.com.

责任作者:常金华(1965-),女,博士,教授,现主要从事作物遗传育种等研究工作。E-mail:jhchang2006@126.com.

收稿日期:2017-04-17

用25%次氯酸钠消毒、茎段用0.1%升汞进行消毒,最后均用无菌水冲洗4~5遍,用灭菌的滤纸吸去外植体表面多余水分。

1.2.2 不定芽诱导试验

将嫩梢的茎尖切下,在显微镜下剥离叶片制备0.8~1.0 mm的微茎尖及1.5~2.0 cm的带芽茎段分别接种到改良MS+6-BA 1.1 mg·L⁻¹培养基上,于光强为30~40 μmol·m⁻²·s⁻¹,光照时间14 h(16 h光照/8 h黑暗)下培养,培养温度为(25±2)℃。接种后3 d,统计污染率,污染率(%)=受污染外植体数/总外植体数×100;接种30 d,统计成活率,成活率(%)=成活外植体数/总外植体数×100。试验设3次重复,每个处理20个样本。

1.2.3 增殖继代培养

接种外植体30 d后,待成活的微茎尖分化的不定芽长至1~2 cm时,将其切下作为新外植体继续于A、B、C、D、E、F 6种激素配比分别为6-BA 1.1 mg·L⁻¹+KT 0 mg·L⁻¹、6-BA 1.1 mg·L⁻¹+KT 0.2 mg·L⁻¹、6-BA 1.1 mg·L⁻¹+KT 0.4 mg·L⁻¹、6-BA 1.1 mg·L⁻¹+KT 0.5 mg·L⁻¹、6-BA 1.1 mg·L⁻¹+KT 0.6 mg·L⁻¹、6-BA 1.1 mg·L⁻¹+KT 0.8 mg·L⁻¹的改良MS培养基上进行继代培养。在P≤0.05水平对同品种不同KT浓度下的平均增殖芽个数进行多重比较。

1.2.4 生根培养

待继代培养的幼苗生长至3~5 cm时,接种到不同激素配比的1/2 MS培养基上进行生根诱导。每处理3次重复,每个重复20瓶,每瓶接种3棵幼苗,接种后30 d统计生根率、平均生根数以及根的生长情况。生根率(%)=生根外植体数/总外植体数×100,平均生根数=总根条数/生根外植体数。

1.2.5 练苗及移栽试验

待幼苗长至4~5 cm高、具5~6片叶子时,逐渐打开锥形瓶的封口膜,7 d后将试管苗取出,用灭菌水将根部残留的培养基洗净,在稀释的1 000倍百菌清溶液中浸泡2 min,移栽至

128孔穴盘中,培养基质为灭菌蛭石:泥炭(1:1),移栽后浇水并保持温室温度、湿度,用塑料薄膜覆盖2~3 d,然后揭开薄膜,逐渐从温室环境向自然环境过渡,每5~7 d喷洒一次1 000倍多菌灵,30 d后统计试管苗成活率,期间喷施2次营养液。

1.3 数据分析

利用Excel和SPSS 19.0软件进行数据分析,通过多重比较分析采样时间、启动继代培养、生根诱导、练苗移栽等对快繁效率的影响。

2 结果与分析

2.1 不同取材时间及外植体类型对成活率的影响

由表1可知,3个品种在初春葡萄枝条冬芽萌动后不久(5月10日)取样,污染率均低于20%,成活率可达75%以上。第二次取样(6月15日)平均污染率为20%~30%,成活率60%~70%。随着时间推移,成活率呈下降趋势,至8月中旬(8月15日)污染率达50%~80%,成活率不足50%。可见,取样时间越晚,污染率越高,成活率越低,不定芽诱导的成功率与取样时期有显著关系。由表2、3可知,同品种前期带芽茎段成活率高于茎尖,后期则低于茎尖成活率,二倍体“玫瑰香”枝条细,茎尖瘦弱,茎尖及茎段诱导成活率低于四倍体“玫瑰香”和四倍体“巨玫”。

2.2 不同激素与葡萄倍性对增殖倍数的影响

由表4可知,改良MS+6-BA 1.1 mg·L⁻¹+KT 0.5 mg·L⁻¹培养基更适于微茎尖的分化,所以用改良MS作为继代培养基,将分化的茎尖接种到MS上,20 d后统计成活率、增殖倍数及生长情况。由表5可知,增殖倍数最高的为四倍体“玫瑰香”(6.0),其次是四倍体“巨玫”(5.0),二倍体“玫瑰香”增殖倍数最低(3.0),四倍体“玫瑰香”与四倍体“巨玫”继代成活率均高于二倍体“玫瑰香”。2个四倍体品种的茎尖生长状况良好,茎粗壮,叶片嫩绿,再分化能力强,平均增殖倍数显著高于二倍体“玫瑰香”。

表 1 不同倍性品种不同外植体污染率、成活率的比较

Table 1 Comparison of contamination rate and survival rate of different ploid

取样时间 Sampling time/(月-日)	品种 Variety	外植体类型 Explant type	接种数 Inoculation number	污染数 Pollution number	污染率 Pollution rate/%	成活数 Survival number	成活率 Survival rate/%
05-10	四倍体“玫瑰香”	茎尖	50	7	14	41	82
		茎段	30	3	10	26	87
	四倍体“巨玫”	茎尖	50	5	10	43	86
		茎段	30	2	7	27	90
	二倍体“玫瑰香”	茎尖	50	9	18	39	78
		茎段	30	6	20	23	80
06-15	四倍体“玫瑰香”	茎尖	50	15	30	33	69
		茎段	30	4	13	21	70
	四倍体“巨玫”	茎尖	50	13	26	36	72
		茎段	30	7	23	19	63
	二倍体“玫瑰香”	茎尖	50	11	22	34	68
		茎段	30	8	27	18	60
08-20	四倍体“玫瑰香”	茎尖	50	27	54	20	40
		茎段	30	22	73	7	23
	四倍体“巨玫”	茎尖	50	24	48	24	48
		茎段	30	17	57	11	37
	二倍体“玫瑰香”	茎尖	50	31	62	17	34
		茎段	30	26	87	3	10

表 2 不同取样时间下各品种茎尖成活率

Table 2 Survival rate of shoot tip at different sampling time %

取样时间 Sampling time/(月-日)	05-10	06-15	08-20
四倍体“玫瑰香” Tetraploid ‘Muscat Hamburg’	82	69	40
四倍体“巨玫” Traploid ‘Jumei’	86	72	48
二倍体“玫瑰香” Diploid ‘Muscat Hamburg’	78	68	34

表 3 不同取样时间下各品种带芽茎段成活率

Table 3 Survival rate of stem segments with buds at different sampling time %

取样时间 Sampling time/(月-日)	05-10	06-15	08-20
四倍体“玫瑰香” Tetraploid ‘Muscat Hamburg’	87	70	23
四倍体“巨玫” Traploid ‘Jumei’	90	63	37
二倍体“玫瑰香” Diploid ‘Muscat Hamburg’	80	60	10

表 4 6-BA 与不同 KT 配比处理的平均增殖芽个数

Table 4 Average number of proliferating buds in 6-BA and different KT ratio treatments

品种 Variety	处理 Treatment					
	A(CK)	B	C	D	E	F
四倍体“玫瑰香” Tetraploid ‘Muscat Hamburg’	1. 3d	2. 4c	3. 1bc	6. 3a	5. 8a	3. 7b
四倍体“巨玫” Traploid ‘Jumei’	1. 4d	2. 3c	3. 5b	5. 4a	5. 1a	3. 8b
二倍体“玫瑰香” Diploid ‘Muscat Hamburg’	1. 2d	1. 8d	2. 4c	3. 2a	3. 0b	2. 9b

注:同行不同小写字母表示差异达 0. 05 显著水平。

Note: Values followed by different lowercase letters within the same line are significantly different at 0. 05 level.

表 5
Table 5
不同基因型增殖倍数的影响
Effects of different genotypes on multiplication

品种 Variety	成活率 Survival rate/%	平均增殖芽个数 Average number of adventitious buds	平均增殖倍数 Average multiplication	茎尖生长情况 Growth of shoot tip
四倍体“玫瑰香” Tetraploid ‘Muscat Hamburg’	95a	6.3a	6a	茎粗壮,叶嫩绿
四倍体“巨玫” Traploid ‘Jumei’	92a	5.4a	5a	茎粗壮,叶嫩绿
二倍体“玫瑰香” Diploid ‘Muscat Hamburg’	85b	3.2b	3b	茎较弱,叶浅绿

注:同列不同小写字母表示差异达 0.05 显著水平。
Note: Values followed by different capital letters within the same trait are significantly different at 0.05 level.

2.3 不同激素对生根诱导的影响

由表 6 可知,IAA 0.5 mg·L⁻¹、IBA 0.1 mg·L⁻¹、NAA 0.3 mg·L⁻¹ 3 个处理后,各品种生根效果最好。生根率均达到 90%以上,单株平均生根数达到 3 条以上。观察生根情况发现,以上 3 个处理下的幼苗、根均生长良好。在 IAA、IBA、NAA 各自最优激素水平下不同激素处理的结果差异不

显著。3 种激素在不同倍性葡萄品种间无显著差异,IAA、IBA 促进根伸长,而 NAA 促进根萌发,形成丛生根。随 IAA 浓度增大,“巨玫”和四倍体“玫瑰香”生根促进作用明显,而二倍体“玫瑰香”随 IAA 浓度增大,其生根效果基本保持不变。根诱导过程中,二倍体“玫瑰香”不定根数量及生根率均优于四倍体“玫瑰香”和“巨玫”。

表 6
Table 6
不同激素配比各品种的生根情况
Rooting of varieties in different hormone combinations

品种 Variety	处理 Treatment/(mg·L ⁻¹)	平均生根数 Average rooting number	生根率 Rooting rate/%	根生长情况 Growth of root
四倍体“玫瑰香” Tetraploid ‘Muscat Hamburg’	IAA 0.1	1.8	65.2	细长,生长均匀
	IAA 0.3	2.3	86.3	细长,生长均匀
	IAA 0.5	3.8	93.5	细长,生长均匀
	IBA 0.1	4.2	97.8	粗壮,无畸形
	IBA 0.3	2.0	71.1	粗壮,无畸形
	IBA 0.5	1.7	59.2	粗壮,畸形
	NAA 0.1	4.1	77.5	短粗
	NAA 0.3	4.5	95.6	短粗,生长良好
	NAA 0.5	3.2	90.4	短粗,畸形
	CK	1.3	9.8	生长均匀,良好
四倍体“巨玫” Traploid ‘Jumei’	IAA 0.1	1.9	61.1	细长,生长均匀
	IAA 0.3	2.6	83.2	细长,生长均匀
	IAA 0.5	3.4	92.6	细长,生长均匀
	IBA 0.1	5.3	95.2	粗壮,无畸形
	IBA 0.3	3.1	77.1	粗壮,无畸形
	IBA 0.5	1.9	62.5	粗壮,畸形
	NAA 0.1	4.8	80.8	短粗
	NAA 0.3	5.0	97.1	短粗,生长良好
	NAA 0.5	3.5	92.2	短粗,畸形
	CK	1.5	10.4	生长均匀,良好
二倍体“玫瑰香” Diploid ‘Muscat Hamburg’	IAA 0.1	3.3	90.3	细长,生长均匀
	IAA 0.3	3.5	93.4	细长,生长均匀
	IAA 0.5	3.6	96.7	细长,生长均匀
	IBA 0.1	5.8	98.2	粗壮,无畸形
	IBA 0.3	3.4	75.2	粗壮,无畸形
	IBA 0.5	3.1	59.6	粗壮,畸形
	NAA 0.1	5.1	78.5	短粗
	NAA 0.3	6.3	97.8	短粗,生长良好
	NAA 0.5	3.9	94.6	短粗,畸形
	CK	2.4	16.5	生长均匀,良好

2.4 练苗移栽

对葡萄试管苗成活率的调查结果显示,葡萄试管苗移栽在混合基质蛭石:泥炭(1:1)混合基质中,成活率为 94.3%,说明可以用扦插枝条的混合基质来作为温室练苗的基质使用。经试验证明在混合机制的配比上,不仅要保证营养和水分,透气性也是一重要因素,基质疏松,保水性透气性好,有利于提高移栽成活率。

3 讨论

建立优良葡萄品种的快繁体系,可快速繁殖优良品种,减少病害,而且可以完全保持母本优良性状,有利于加快优良品种的推广。

3.1 外植体消毒及类型对无菌培养的影响

作为组织培养的第一步,外植体消毒尤为重要,而不同外植体其灭菌剂类型、处理时间均不相同。试验证明由于升汞消毒效率高同时对植物体伤害大,所以不宜用于幼嫩的茎尖消毒,该试验采用次氯酸钠对茎尖消毒,达到良好的效果。进入 8、9 月,由于雨季来临,导致霉菌孢子繁殖活跃,葡萄病菌病频繁,这一时期以后,实验室灭菌杀毒困难,消毒时间过久,外植体褐化严重。此外,8、9 月 3 个品种的新梢已经度过快速生长期,此时的茎尖和茎段增殖倍数显著减低,不利于建立快速繁殖体系。

茎尖和带芽茎段作为细胞分裂旺盛部位,是理想的接种材料。茎尖生长点几乎不含病毒,所以是获得脱毒苗最理想外植体^[7],带芽茎段携带病毒相对较多,灭菌困难,但其腋芽萌发快,生长健壮,亦可作为组培材料。

3.2 诱导和继代培养基的选择

该试验采用改良 MS+6-BA $1.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 培养基进行诱导,然后在启动培养基中再加入 KT $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 进行继代培养。在启动诱导阶段,该试验仅使用 $1.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA。但后续继代过程中会出现生长缓慢或者褐死现象,需在启动培养基中再加入 KT $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,使继代过程中外植体保持叶浓绿,茎健壮,无畸形。褐变主要是因为所选外植体中含有的较多酚类物质被氧化

成醌导致的,严重影响外植体生长能力,添加活性炭也可以明显减轻褐变,有利于外植体生长,浓度一般为 $0.1\% \sim 0.3\%$ ^[8]。

3.3 诱导生根

研究表明,单独使用 IBA、IAA、NAA 均可促进组培苗生根,就该试验而言,IAA 在不同倍性品种中的促进作用存在差异,而 IBA 和 NAA 的促进作用并无显著差异,NAA 可作为首选生根激素,应于不同品种的生根培养。为避免工作量增加,同时又加速快繁进度,可在生根培养基中添加 6-BA,使继代培养与生根同时进行。白瑞兴等^[9]的培养基选用 B5 培养基且大量元素减半、添加 IAA $0.2 \sim 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的培养基,一次性成苗且植株生长健壮,成苗率高。另外在组织培养过程中,内源激素的变化对植物生长的也具有重要影响。齐永顺等^[10]研究发现,根原基诱导期的内源激素水平对根原基的发生和后期不定根的发育具有重要作用,在生根诱导过程中,植物根的生长、加粗均受到内源性激素 IAA、ABA 等的调节^[11]。曹为王等^[12]认为不同葡萄品种在培养过程中对生长素浓度需求大不相同。该试验在二倍体玫瑰香诱导生根过程中,随着 IAA 在一定范围内增大,未表现出如四倍体“玫瑰香”和“巨玫”一样的促进作用。可能是同源加倍以后的二倍体“玫瑰香”,其内源生长素与脱落酸等生根抑制剂的比值变化,导致其生根能力对外源激素的反应不同。

3.4 组培成苗的练苗移栽

在练苗移栽中,不仅要注意混合基质的灭菌消毒,还要保证透气保水性,在移栽初期,幼苗对温度、湿度要求严格,湿度不够幼苗迅速脱水萎蔫,所以移栽后的 1 周要用塑料薄膜将穴盘封住,同时又要留出足够空间,然后逐步调节光照和温度,直到与外界环境一致,等组培苗长出 1~2 片新叶,叶浓绿有光泽时再移入苗圃,基本可保证 90% 成活率。

4 结论

该试验于 5—8 月以四倍体“玫瑰香”、四倍体

“巨玫”、二倍体“玫瑰香”3个品种当年幼嫩茎尖作为外植体,对不同倍性,不同基因型的葡萄品种,在取样时间、诱导培养、继代增殖培养、生根培养以及练苗移栽进行了系统研究发现,最适宜采样时期为5月中旬,茎尖作为外植体,诱导茎尖的最适培养基为 $C_2D+6-BA\ 1.1\ mg \cdot L^{-1}$ 。继代培养最适培养基为 $C_2D+6-BA\ 1.1\ mg \cdot L^{-1}+KT\ 0.5\ mg \cdot L^{-1}$,不同倍性葡萄品种在组培过程中增殖差异较大。最适宜生根培养基为 $1/2MS+NAA\ 0.30\ mg \cdot L^{-1}$ 、 $1/2MS+IAA\ 0.50\ mg \cdot L^{-1}$ 和 $1/2MS+IBA\ 0.10\ mg \cdot L^{-1}$,生根率均达90%以上,二倍体“玫瑰香”不定根数量及生根率均优于四倍体“玫瑰香”和“巨玫”。

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] STAMP J A, MEREDITH C P. Somatic embryogenesis from leaves and anthers of grapevine[J]. Scientia Horticulturae, 1988, 35(3-4): 235-250.
- [3] BARLASS M, SKENE K G. *In vitro* propagation of grapevine (*Vitis vinifera* L.) from fragmented shoot apices[J]. Vitis, 1981, 17: 335-340.
- [4] STAMP J A, COLBY S M. Direct shoot organogenesis and plant regeneration from leaves of grapes (*Vitis* spp.)[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1990, 22(2): 127-133.
- [5] 王敬东,张丽,马洪爱,等.宁夏三个葡萄品种高效再生体系的建立[J].北方园艺,2011(22):118-121.
- [6] ROBERT O, ANIKO Z, ANDRZEJ P, et al. Somatic embryogenesis in a broad spectrum of grape genotypes[J]. Scientia Horticulturae, 2009, 120: 134-137.
- [7] 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.
- [8] ALUNKHE C K, RAO P S, MHATRE M. Induction of somatic embryogenesis and plantlets[J]. Plant Cell Reports, 1997, 17(1): 65-67.
- [9] 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.
- [10] 齐永顺,张志华,王同坤,等.同源四倍体玫瑰香葡萄嫩枝扦插不定根发生过程中内源激素的变化[J].园艺学报,2009(4): 565-570.
- [11] 马海燕.葡萄生长过程中内源激素含量变化的研究[D].杨凌:西北农林科技大学,2007.
- [12] 曹为王,郑燕棠,张福庆,等.葡萄茎尖脱毒培养和快速繁殖[J].华北农学报,1993(2):69-72.

Efficiency of Rapid Propagation of Different Grape Varieties

QIAO Haiyu, XIANG Xiaodong, REN Genzeng, CUI Jianghui, CHANG Jinhua
(College of Agriculture, Hebei Agricultural University, Baoding, Hebei 071001)

Abstract: Three different ploidy grape tetraploid ‘Muscat Hamburg’, ‘Jumei’, diploid ‘Muscat Hamburg’ were used as materials in this study. The effect of different hormones and hormone concentration in the tissue culture and different sampling time on the efficiency of rapid propagation. The results showed that the optimum sampling time was in mid-May, the suitable medium for the induction and subculture were $MS+6-BA\ 1.1\ mg \cdot L^{-1}+KT\ 0.5\ mg \cdot L^{-1}$; $MS+6-BA\ 1.1\ mg \cdot L^{-1}+KT\ 0.5\ mg \cdot L^{-1}$. In the same culture condition, adventitious bud proliferation times of the tetraploid ‘Muscat Hamburg’ and tetraploid ‘Jumei’ was higher than diploid ‘Muscat Hamburg’. In the rooting process, diploid ‘Muscat Hamburg’ showed better than ‘Jumei’ and tetraploid ‘Muscat Hamburg’. The optimum rooting medium were $1/2MS+NAA\ 0.30\ mg \cdot L^{-1}$, $1/2MS+IAA\ 0.50\ mg \cdot L^{-1}$ and $1/2MS+IBA\ 0.10\ mg \cdot L^{-1}$ respectively for three grape cultivars. The optimum mixed ratio of vermiculite and peat was 1:1 for acclimatization, the survival rate was more than 90%.

Keywords: grape; rapid regeneration; meristem culture