

葡萄组织培养快速繁殖体系研究

李国树, 邱璐, 徐成东, 范树国

(楚雄师范学院化学与生命科学系 滇中高原生物资源开发与利用研究所, 云南 楚雄 675000)

摘要:以葡萄茎尖、茎段、叶柄、根尖为外植体, 对葡萄外植体的选择、愈伤诱导、茎叶分化苗、不定根诱导及试管苗的练苗移栽过程进行研究。结果表明: 外植体以茎尖为最佳, 茎尖愈伤诱导最适培养基: $1/2MS+6-BA\ 1.0\ mg/L+IBA\ 0.10\ mg/L$, 诱导率达 95%; 茎叶分化以 $1/2MS+6-BA\ 1.5\ mg/L+IBA\ 0.10\ mg/L$, 分化率达 100%; 生根培养以 $1/2MS+IBA\ 1.0\ mg/L$ 为佳, 生根率达 90.3%。

关键词: 葡萄; 组织培养; 快速繁殖

中图分类号: S 663.103.6 **文献标识码:** B **文章编号:** 1001-0009(2011)09-0134-03

葡萄是葡萄科(Vitaceae)葡萄属(*Vitis*)多年落叶藤本植物, 因其栽培品种多、适应性强、果实营养丰富, 广泛用于鲜食、酿酒和加工制作葡萄干、葡萄汁等食品而成为在全国各地广泛栽培的主要果树之一。

生产上葡萄育苗主要采用扦插繁殖, 但长期采用扦插繁殖, 容易导致品种退化、尤其在南方多雨地区, 扦插苗易受病虫害感染影响苗木质量。植物组织培养^[1]就是将植物体的组织、器官、细胞应用无菌操作, 使其在人工条

件下能够继续生长, 甚至分化发育成一完整的植物的过程。植物组织培养技术可用于新品种的快速繁殖, 不受季节、地区、气候、病虫等因素影响, 可周年进行生产, 因此, 该试验从葡萄组织培养的外植体选择、愈伤组织、茎叶分化、不定根诱导优化及试管苗的练苗移栽过程进行研究, 系统研究葡萄组织培养快速繁殖体系, 为葡萄组培快速繁殖和大规模工厂化育苗体系提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

葡萄茎尖、茎段、叶柄、根尖 4 种外植体材料取自楚雄州果园葡萄生产园。

1.2 试验方法

1.2.1 外植体处理 供试材料带回实验室后, 将材料切成 3~5 cm 的节段, 用洗涤剂泡洗 5 min 后, 再用无菌水冲洗 5~6 次, 转至超净工作台上用 70% 的消毒酒精消毒 10 s, 迅速倒出酒精, 用无菌水清洗 3~5 次, 滤干水分后用 0.1% $HgCl_2$ 消毒 4 min 后再用无菌水清洗 8~10 次。用消过毒的剪刀剪段, 除去两端伤口, 长约在

第一作者简介: 李国树(1969-), 男, 彝族, 云南永仁人, 高级讲师, 现从事植物学及植物资源开发与利用研究工作。E-mail: hxxlgs@xtc.edu.cn。

基金项目: 楚雄师范学院学术后备人才资助项目(08YJRC22); 云南省植物学重点学科建设资助项目(05YJJSXK03); 云南省应用基础研究计划资助项目(2008CD218); 云南省中青年学术技术带头人后备人才计划资助项目(2006PY01-61)。

收稿日期: 2011-01-18

Study on Callus Induction and Proliferation of *Reinwardtia trigyna* (Roxb.) Planch

GU Yu, XU Qiang, LI Long

(College of Biology and Science, Sichuan Agricultural University, Yaan, Sichuan 625014)

Abstract: The leaves and stems of *Reinwardtia trigyna* (Roxb.) Planch were used as explants to study the callus induction and proliferation, in order to explore the optimum conditions of induction and proliferation. The results indicated that both leaves and stems could induce callus, but the best explant was leaf. The suitable sterilization time for leaves and stems with 0.1% mercury bichloride were 6 min and 10 min. The optimal induction medium for leaf were $B_5+0.6\ mg/L\ 6-BA+2.0\ mg/L\ NAA$, and proliferation medium were $B_5+0.6\ mg/L\ 6-BA+1.25\ mg/L\ NAA$. Impact on callus induction were $NAA>6-BA>$ basic medium.

Keywords: *Reinwardtia trigyna* (Roxb.) Planch; callus; induction condition; proliferation condition

0.5~1.0 cm, 将材料正插于培养基中, 保持与培养基充分接触, 每瓶插入 3 段。

1.2.2 筛选最适外植体 将已充分消毒灭菌后的葡萄茎尖、茎段、叶柄、根尖 4 种外植体接种于 1/2MS+6-BA 1.0 mg/L+IBA 0.03 mg/L+GA 0.2 mg/L^[2-3] 中, 接种 30 d 后统计 4 种外植体接种后产生愈伤组织效果。

1.2.3 筛选愈伤诱导最适培养基 以 MS、1/2 MS、B₅、N₆ 为基本培养基, 分别加入 6-BA 1.0 mg/L+IBA 0.5 mg/L 得到①、②、③、④ 4 种培养基来进行诱导愈伤组织试验。琼脂浓度 8.0 g/L, 蔗糖浓度 2.5%, pH 5.8。在 4 种培养基中接种茎尖培养得到的无菌苗外植体, 观察统计愈伤组织的产生及其形成效果, 筛选出最佳培养基。

1.2.4 筛选茎叶分化最适佳培养基 以 1/2 MS 为基本培养基, 设计不同激素配比: ⑤: 6-BA 0.5 mg/L+IBA 0.5 mg/L; ⑥: 6-BA 1.0 mg/L+IBA 0.5 mg/L; ⑦: 6-BA 1.5 mg/L+IBA 0.5 mg/L; ⑧: 6-BA 2.0 mg/L+IBA 1.0 mg/L 来筛选茎叶分化最适佳培养基。

1.2.5 筛选生根最适培养基 诱导不定根的培养基用 1/2MS+IBA (0.0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 mg/L) 和 1/2MS+NAA (0.0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 mg/L), 每个处理 5 瓶, 共 15 瓶。

1.2.6 培养条件 培养温度 28℃, 每天光照培养 12 h, 光照强度 2 000 lx。接种 30 d 后分别统计愈伤组织、茎

段分化、不定根数量及生长效果。

1.2.7 练苗与移栽 待试管苗长出大量根系、有 3~5 片叶后进行练苗、移栽过程。

2 结果与分析

2.1 最适外植体筛选

将充分消毒灭菌后的葡萄茎尖、茎段、叶柄、根尖外植体接种于 1/2MS+6-BA 1.0 mg/L+IBA 0.03 mg/L+GA 0.2 mg/L 培养基中, 接种 30 d 后统计: 90% 的茎尖生成愈伤组织、78% 的茎段生成愈伤组织、40% 的根尖生成愈伤组织、5% 的叶柄生成愈伤组织。因此, 利用分裂生力较强的茎尖是葡萄组织培养的最适外植体。

2.2 愈伤诱导的最适培养基筛选

筛选出最佳外植体后, 将已充分消毒灭菌后的葡萄茎尖接种于①、②、③、④ 4 种培养基中, 进行培养管理, 接种 30 d 后统计结果。由表 1 可知, 葡萄茎尖外植体在②号培养基诱导愈伤组织的效果最好, 愈伤组织呈深绿色、颗粒状, 愈伤分化率最高, 达 97%, 愈伤组织的生长速度也最快, 因此 1/2MS+6-BA 2.0 mg/L+IBA 1.5 mg/L 培养基较适合于葡萄茎尖诱导愈伤组织; 其次是①培养基, 愈伤组织呈浅绿色, 愈伤分化率达 83%, 但愈伤生长速度比②培养基慢较, 而③、④号培养基中形成愈伤组织较差, 呈黄白色, 生长速度慢。

表 1 葡萄茎尖在 4 种激素配比培养基中形成茎叶分化统计结果

培养基	接种茎尖数	形成愈伤数	分化率/%	30 d 后愈伤生长情况	愈伤组织生长速度
①	30	25	83	愈伤组织呈浅绿色	较快
②	30	29	97	愈伤组织呈深绿色、颗粒状	最快
③	30	12	40	愈伤组织呈黄白色	较慢
④	30	2	7	愈伤组织呈黄白色、玻璃化	最慢

2.3 茎叶分化最适佳培养基筛选

以 1/2MS 为基本培养基, 附加 6-BA (0.5、1.0、1.5、2.0 mg/L) 和 IBA (0.5、1.0 mg/L), 接种深绿色、颗粒状的愈伤组织。接种后观察其生长情况, 30 d 时统计结果。由表 2 可知, 在⑥号培养基(即: 1/2MS+6-BA 1.0 mg/L+IBA 0.5 mg/L)上接种深绿色、颗粒状的愈伤组织后, 能快速形成茎叶分化苗, 分化率也最高, 达 97%, 平均每块愈伤可形成 4.7 个茎叶分化苗, 因此, 用葡萄愈伤组织诱导茎叶分化苗的最适培养基是 1/2MS+6-BA 1.0 mg/L+IBA 0.5 mg/L。

表 2 愈伤组织在 4 种培养基上产生茎叶分化苗统计

培养基	接种愈伤数	形成茎叶分化苗数	分化率/%	茎叶分化苗生长速度	平均每块愈伤组织形成茎叶芽苗的数/个
5	30	25	83	较快	3.1
6	30	29	97	最快	4.7
7	30	12	40	较慢	2.1
8	30	2	7	最慢	1.4

2.4 生根最适培养基筛选

当茎叶分化苗高约 2 cm 时, 接种于诱导不定根的培养基中, 30 d 后进行观察统计。由表 3 可知, 仅用 1/2 MS 不能诱导出不定根, IBA 或 NAA 均能诱导葡萄茎

叶分化苗形成不定根, 并且 IBA 或 NAA 浓度达 1.0 mg/L 时生根率、生根条数和平均根长均达最大, 但浓度超过 1.5 mg/L 时不利于生根。因此, 1/2 MS+IBA 或 NAA 1.0 mg/L 是诱导葡萄茎叶分化苗生根的最适培养基。

表 3 不同浓度 IBA/NAA 对葡萄茎叶分化苗产生不定根的影响

IBA/mg·L ⁻¹	NAA/mg·L ⁻¹	接种数	生根率/%	生根条数	平均根长/cm
0	-	15	0	0	0
0.5	-	15	80	12	2.17
1.0	-	15	90.3	14	3.75
1.5	-	15	60	9	1.60
2.0	-	15	40	6	1.21
-	0	15	0	0	0
-	0.5	15	73.3	11	1.75
-	1.0	15	86.7	13	2.80
-	1.5	15	60	9	1.42
-	2.0	15	20	3	0.72

注: 生根率(%)=生根条数/接种数×100%。

2.5 练苗移栽

当试管苗形成大量根系、有 3~5 片叶、高约 3~8 cm 时, 将培养物移到室内自然光下锻炼 2~3 d, 让其适应室内环境, 再将组培苗瓶盖打开, 在温室内练苗 5~7 d 当茎秆由黄白色变红、叶片油亮时, 从培养瓶中取出小苗, 用自

来水洗掉根部黏着的培养基,移栽于沙床上,覆盖薄膜,RH 达 80%左右。经过 10 d,叶片转绿增大,出现 2~3 片新叶,同时新长出白色侧根时即可移入营养钵或苗床栽植,30 d 后叶片逐渐增大、叶肉增厚,成活率达 95%以上,枝蔓生长即可转入常规栽培管理。

3 结论与讨论

葡萄组织培养可以周年快速繁殖培育出大量的试管苗,但在试验中,茎尖形成愈伤组织的能力比茎段、根尖及叶柄强,表明处于旺盛生长的茎尖内源激素含量较高、再分化能力强,因此应选择旺盛生长或分化程度较轻的组织作为外植体有利于诱导愈伤组织。在试验中还发现,诱导愈伤率与切取外植体的大小呈正相关,过小容易褐化、干枯;过大则容易污染、脱毒效果也不好,因此,外植体大小应控制其在 0.5~1.0 cm 之内为宜。

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,激素具有刺激形成层细胞分裂、诱导愈伤组织、不定芽、不定根的形成等生理作用,在缺乏或较高浓度则会抑制生长,在试验中,葡萄茎尖愈伤诱导

最适培养基 1/2MS+6-BA 1.0 mg/L+IBA 0.10 mg/L;茎叶分化以 1/2MS+6-BA 1.5 mg/L+IBA 0.10 mg/L;生根培养以 1/2MS+IBA 1.0 mg/L 为佳,因此葡萄组织快繁中使用激素浓度不宜过高。

为加快葡萄组培苗的繁殖速度和扩大繁殖量,可以在愈伤组织刚分化出茎叶苗时,用一部分诱导不定根,另一部分进行继代扩繁,既可以维持一定的繁殖量,又可提高组培苗数量。

参考文献

- [1] 张志良,瞿伟菁.植物生理学实验指导[M].北京:高等教育出版社,2003:248.
- [2] 李国树.黑虎香葡萄茎尖培养试验初报[J].中国南方果树,2010,39(3):74-75.
- [3] 李国树,范树国,邱璐,等.水晶葡萄茎尖组织培养研究[J].中国南方果树,2010,39(2):66-67.
- [4] 曾斌,罗淑萍,任盈盈,等.木纳格葡萄组织培养快繁技术的研究简报[J].新疆农业科学,2007(3):340-343.
- [5] 张建华,庄天明,孙占刚,等.华佳 8 号葡萄的离体繁殖技术[J].上海交通大学学报(农业科学版),2004(9):309-312.

Research on Tissue Culture and Rapid Propagation of Grapes

LI Guo-shu, QIU Lu, XU Cheng-dong, FAN Shu-guo

(1. Department of Chemistry and Life Science, Chuxiong Normal University, Chuxiong, Yunnan 675000; 2. Institute for Bio-resources Research and Development of Central Yunnan Plateau, Chuxiong, Yunnan 675000)

Abstract: Shoot tip, stem, petiole, root tip of grapes were used as explants to study on the choice of explants, callus induction, stem and leaf differentiation seedlings, adventitious root induction and *in vitro* transfer of training seedlings, planting process. The results showed that the best explant was meristem-tip, the most suitable medium for callus induction was 1/2MS+6-BA 1.0 mg/L+IBA 0.10 mg/L, inductivity 95%. The best medium for adventitious bud induction was 1/2MS+6-BA 1.5 mg/L+IBA 0.10 mg/L, the percentage of callus differentiation 100%; The most appropriate medium for adventitious root induction was 1/2MS+IBA 1.0 mg/L, rooting rate 90.3%.

Key words: grape; tissue culture; rapid propagation

新型氮肥增效剂研制成功

新疆石河子大学日前发布了由中国农科院、石河子大学与浙江奥复托化工有限公司联合研制成功新型氮肥增效剂—碧晶 N⁺。碧晶 N⁺ 具有自主知识产权,打破了国际农化巨头在该产品上维持了近半个世纪的技术垄断。研究表明,与目前效果较好的国外产品相比,碧晶 N⁺ 只需使用约四分之一的用量就可以达到相同的硝化抑制效果,而且产品成本低,可适用于大田使用。碧晶 N⁺ 可以显著减少氮肥在淋溶流失 16%,缓解湖泊面临的富营养化威胁;可以减少农田氮源温室气体氧化亚氮的排放量 51%,有助于低碳农业目标的实现,增加土壤中氮营养的含量 28%,从而改善和提升土壤肥力。在提高氮肥利用率的同时,实现了低碳、环保的效果。

浙江奥复托公司与中国农科院农业资源与区划研究所自 2006 年开始该产品的研发工作。2009 年,石河子大学农学院加盟进行室内与大田应用研究。2009 年在新疆地区有代表性的 3 种农作物即小麦、加工番茄、棉花上进行了碧晶 N⁺ 的大田试验,取得了 5%~20% 的显著增产效果。在减少 30% 氮肥用量的情况下,小麦、棉花平产,而加工番茄增产 5%。2010 年,与农一师、农二师、新赛股份等新疆种植业龙头企业合作,建立了 167 hm² 示范试验田,增加了葡萄、甜菜、辣椒、大枣、旱稻等多种作物,田间试验效果明显。经测产表明,小麦增产幅度达到 10%,其它作物在植株和结实方面明显优于同类未施用该产品作物。