

## 酿酒葡萄“赤霞珠”组织培养快繁技术优化

徐美隆<sup>1,2</sup>, 刘 静<sup>1,2</sup>, 王巧珍<sup>1,2</sup>, 袁 婷<sup>1,2</sup>

(1. 宁夏林业研究院股份有限公司, 宁夏 银川 750004; 2. 国家经济林种苗快繁工程技术研究中心, 宁夏 银川 750004)

**摘 要:**以酿酒葡萄“赤霞珠”为试材,采用组织培养法,研究了不同基本培养基与不同 IBA 浓度的组合及不同培养容器对酿酒葡萄“赤霞珠”试管苗生长的影响,以期优化酿酒葡萄“赤霞珠”试管苗培养技术体系。结果表明:适合“赤霞珠”试管苗组织培养的最佳培养基为  $1/2B_5 + 0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ IBA} + 30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \text{ 蔗糖} + 7 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \text{ 琼脂} + 1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \text{ 活性炭}$ ;在透气膜直径为 3.0 cm,透光率为 90% 的玻璃培养容器中,“赤霞珠”试管苗生长健壮,移栽成活率最高,达 96.67%。

**关键词:**酿酒葡萄;组织培养;条件优化

**中图分类号:**S 663.103.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2016)22-0117-04

密闭的培养环境及偏弱的光照强度是促使植物试管苗徒长、生长势变弱、移栽成活率偏低的主要原因,增强试管苗的生长势,提高试管苗移栽成活率是实现植物组培工厂化繁育的关键环节之一。虽然关于葡萄组培快繁技术的研究已有较多的相关报道,但多数还是以筛选不同成分的培养基为研究出发点,该试验在筛选出适合酿酒葡萄“赤霞珠”增殖生根培养基的基础上研究了不同条件对葡萄试管苗生长情况的影响,以期为提高葡萄试管苗的移栽成活率提供保障,也为实现葡萄试管苗的工厂化生产奠定良好的基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试材料为生长健壮、长势均一的酿酒葡萄“赤霞珠”试管苗,由国家经济林种苗快繁工程技术研究中心提供。

### 1.2 试验方法

1.2.1 “赤霞珠”葡萄试管苗生根培养基配方优化 采用二因素重复试验,分别以  $1/2\text{MS}$ 、 $\text{MS}$ 、 $1/2B_5$ 、 $B_5$ 、 $\text{GS}$  为基本培养基,添加  $0$ 、 $0.2$ 、 $0.4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的 IBA(附加  $3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  蔗糖、 $7 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  琼脂和  $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  活性炭),pH 6.5,共设 15 个处理,各处理分别编号 1~15(表 1)。每个处理 10 瓶,重复 3 次。选取生长一致的“赤霞珠”葡萄试管苗,剪取每株第 3、4 节(带 2 片叶)作为外植体,

接种于上述各处理中进行培养。培养条件:光照强度  $3\,000 \text{ lx}$ ,光照时间  $16 \text{ h} \cdot \text{d}^{-1}$ ,培养温度  $(25 \pm 3)^\circ\text{C}$ 。14 d 统计生根率、平均生根数,根长等指标,28 d 统计组培苗后期生长情况。生根率(%) = 生根总株数/接种总株数  $\times 100$ 。

表 1 培养基优化配方

处理 Treatment	基本培养基 Medium	IBA 浓度 Concentration of IBA/( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )
1		0
2	$1/2\text{MS}$	0.2
3		0.4
4		0
5	$\text{MS}$	0.2
6		0.4
7		0
8	$1/2B_5$	0.2
9		0.4
10		0
11	$B_5$	0.2
12		0.4
13		0
14	$\text{GS}$	0.2
15		0.4

1.2.2 “赤霞珠”葡萄试管苗培养容器的优化研究 以玻璃瓶(透光率 90%)、PC 塑料瓶(透光率 80%)与直径大小分别为 1.0、3.0 cm 的透气膜材料相互组合,进行“赤霞珠”葡萄试管苗培养容器优化试验。试验共设 4 个处理(表 2),每个处理 10 瓶,重复 3 次。培养条件同上。28 d 后统计新生芽株高、新生芽鲜质量、横径以及叶绿素值和光合速率(均以倒三叶为测量对象)。30 d 后统计移栽成活率。移栽成活率(%) = 试管苗移栽成活的株数/移栽苗的总株数  $\times 100$ 。

**第一作者简介:**徐美隆(1979-),男,硕士,副研究员,现主要从事植物生物技术等研究工作。E-mail: xumeilong@senmiao.com.

**基金项目:**引进国际先进林业科学技术资助项目(2014-4-55)。

**收稿日期:**2016-08-04

表 2 培养容器优化试验设计

Table 2 Design for optimization of culture vessel

处理 Treatment	容器类型 Container type	透气膜直径 Permeable membrane diameter/cm
1	玻璃瓶(透光率 90%)	3.0
2		1.0
3	PC 塑料瓶(透光率 80%)	3.0
4		1.0

1.2.3 “赤霞珠”葡萄试管苗练苗及移栽 试管苗培养 18~20 d 后,将株高长至 4~5 cm,且有 2~3 个根,根长为 2~3 cm 的试管苗从培养室移至温室进行练苗,练苗时间 7~10 d,整个练苗期间光照强度不超过 6 000 lx,温度控制在 20~30 ℃,移栽前一日打开瓶盖,瓶内空气相对湿度控制在 80% 以上。将练苗后的“赤霞珠”葡萄脱毒组培试管苗从培养瓶中取出,剪掉过长的根,保留 3~4 cm 长的根,用清水小心洗净根部的培养基,然后将试管苗移栽至规格为 50 穴的穴盘,移栽基质配方为草炭:蛭石:珍珠岩=1:1:2(V/V/V),移栽基质在使用前用 50% 多菌灵 800~1 000 倍液均匀喷湿消毒。试管苗从瓶内移栽至穴盘后 12~15 d,温室空气相对湿度控制在 80% 以上,待长出新根后,逐渐降低空气相对湿度,直至温室正常湿度,在葡萄试管苗移栽后期管理的整个环节,基质湿度控制在 40%~70%,温度控制在 20~30 ℃。

### 1.3 数据分析

采用 DPS 8.01 和 Excel 软件对试验数据进行统计分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同培养基处理对“赤霞珠”葡萄试管苗生根的影响

由表 3 可知,“赤霞珠”试管苗生根与基本培养基种类和 IBA 浓度具有一定的相关性,不同成分的基本培养基对“赤霞珠”葡萄生根的影响较大,在生根阶段,低浓度无机盐的培养基更有利于诱导试管苗根系的生长,对比几种基本培养基可以发现,对促进“赤霞珠”葡萄试管苗生根的作用大小依次为  $1/2B_5 > GS > 1/2MS > B_5 > MS$ ,以  $1/2B_5$  为基本培养基,“赤霞珠”葡萄试管苗的生根数多,根生长快,生根率高,而在以  $1/2B_5$  为基本培养基的基础上,添加  $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的 IBA 更有利于“赤霞珠”葡萄试管苗根系的生长。

### 2.2 不同基本培养基及 IBA 配比对“赤霞珠”葡萄试管苗后期生长的影响

由表 4 可知,低浓度无机盐的培养基对“赤霞珠”葡萄试管苗后期生长的促进作用明显大于高浓度无机盐的培养基,在  $1/2B_5$ 、GS 培养基上“赤霞珠”葡萄试管苗生长更快,新生芽株高能达到 4.00 cm 以上,叶片的横径也能达到 2.00 cm 以上,但其叶片的干鲜比较低,

说明“赤霞珠”葡萄试管苗生长的不够壮实;而 GS+ $0.4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  IBA 的培养基上培养的“赤霞珠”葡萄试管苗叶片的干鲜比最高,但其株高和叶片横径又相对较小; $1/2B_5$ + $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  IBA 的培养基上培养的“赤霞珠”葡萄试管苗的株高、叶片大小以及叶片的干鲜比都比较适中。

表 3 不同培养基处理对“赤霞珠”葡萄试管苗生根的影响

Table 3 Effect of different culture media on ‘Cabernet Sauvignon’ grape rooting of test tube seeding

处理 Treatment	生根数 Root number	根长 Root length/cm	生根率 Root rate/%
1	2.80abcd	0.99cd	86.25d
2	3.40abc	1.16abc	92.20b
3	3.40abc	0.75de	83.25e
4	1.20d	0.35g	60.80i
5	1.60cd	0.60ef	72.65f
6	1.60cd	0.29h	56.00j
7	3.80ab	1.28ab	93.40b
8	4.40a	1.37a	94.07a
9	3.00abcd	0.95cd	86.75d
10	2.00bcd	0.59efg	70.55g
11	2.00bcd	0.65ef	73.85f
12	2.40bcd	0.43fgh	65.65h
13	2.60abcd	1.06bc	90.15c
14	3.20abc	1.08bc	89.85c
15	3.00abcd	0.80de	83.60e

注:同列数据后不同小写字母表示差异显著( $P < 0.05$ )。下同。

Note: Different lowercase letters in the same column indicate significant difference at 0.05 level. The same below.

表 4 不同激素浓度及不同基本培养基对“赤霞珠”试管苗后期生长的影响

Table 4 Effect of different hormone concentration and different basic medium on the growth of ‘Cabernet Sauvignon’ grape test tube seedlings

处理 Treatment	株高 Shoot length /cm	鲜质量 Fresh weight /g	干质量 Dry weight /g	干鲜比 Dry/Fresh ratio	叶横径 Leaf width /cm
1	3.93abc	0.12	0.012 3	0.102 5	1.83ab
2	2.87abcd	0.08	0.007 3	0.091 3	1.40bc
3	3.00abcd	0.08	0.008 7	0.108 8	1.57bc
4	0.87d	0.02	0.001 0	0.050 0	0.30c
5	2.90abcd	0.06	0.007 7	0.128 3	1.57bc
6	3.30abc	0.11	0.013 3	0.120 9	1.63bc
7	4.67a	0.22	0.016 7	0.075 9	3.17a
8	4.00abc	0.16	0.016 7	0.104 4	2.27ab
9	3.67abc	0.09	0.006 0	0.066 7	1.40bc
10	2.20bcd	0.03	0.003 0	0.100 0	1.23bc
11	2.83abcd	0.05	0.004 3	0.086 0	1.30bc
12	1.73cd	0.02	0.001 3	0.065 0	1.23bc
13	4.50ab	0.22	0.005 7	0.025 9	2.00ab
14	3.77abc	0.11	0.007 0	0.063 6	1.60bc
15	2.77abcd	0.05	0.017 3	0.346 0	1.27bc

## 2.3 不同培养容器对“赤霞珠”葡萄试管苗生长的影响

由表5可知,不同培养容器的透光性和透气性对“赤霞珠”葡萄试管苗的生长具有显著的影响。当培养容器的透光率强和透气性增大时,“赤霞珠”葡萄试管苗生长增快,且生长健壮。相对于不同透光性而言,不同透气性对“赤霞珠”葡萄试管苗的株高、叶片鲜质量、叶片大小的影响更加显著。由表6可知,随着培养容器透光性和透气性的增加,“赤霞珠”葡萄试管苗的叶绿素值和光合速率也显著提高,采用透气膜直径为3.0 cm,透光率为90%的玻璃培养容器培养时,叶绿素值和光合速率值均达到最高。

表5 “赤霞珠”葡萄试管苗在不同培养容器中的生长情况

Table 5 Growth of ‘Cabernet Sauvignon’ grape test tube seedlings in different bottles

处理 Treatment	新芽生长量 Bud growth				叶片横径 5%显著水平	
	株高 Shoot length/cm	5%显著水平 Significant level of 5%	鲜质量 Fresh weight/g	5%显著水平 Significant level of 5%	Leaf width /cm	Significant level of 5%
1	4.50	a	0.107	a	1.94	a
2	2.76	b	0.074	b	1.44	b
3	3.28	ab	0.080	b	1.77	a
4	2.63	b	0.043	c	1.29	b

表6 不同培养容器对“赤霞珠”葡萄试管苗生理因素的影响

Table 6 Effect of different culture bottles on the physiological factors of ‘Cabernet Sauvignon’ grape test tube seedling

处理 Treatment	叶绿素值	5%显著水平	光合速率	5%显著水平
	Chlorophyll value /SPAD	Significant level of 5%	Photosynthetic rate /( $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ )	Significant level of 5%
1	8.66	a	1.01	ab
2	6.08	b	0.77	b
3	6.70	b	1.19	a
4	2.71	c	0.85	b

## 2.4 不同培养容器对“赤霞珠”葡萄试管苗移栽成活率的影响

不同培养容器培养的“赤霞珠”葡萄试管苗生长情况和生理指标差异显著,试管苗的健壮程度不一致,影响试管苗的移栽成活率。由表7可知,随着培养容器的透光性增强、透气性增大,培养出的“赤霞珠”葡萄试管苗移栽成活率逐渐增高。在处理1条件下,“赤霞珠”葡萄试管苗移栽成活率最高,达96.67%;在处理4条件下,“赤霞珠”葡萄试管苗移栽成活率最低,为62.00%。

表7 不同培养容器培养对“赤霞珠”葡萄试管苗移栽成活率的影响

Table 7 Effect of different culture bottles on the survival rate of ‘Cabernet Sauvignon’ grape test tube seedling

处理 Treatment	移栽成活率 Survival rate/%	5%显著水平 Significant level of 5%
1	96.67	a
2	72.67	bc
3	85.33	ab
4	62.00	c

## 3 结论与讨论

李琰等<sup>[1]</sup>将培养基因无机盐含量的不同而分为不同类型。葡萄组织培养中,基本培养基中无机盐的浓度与激素水平对比对植株生长和生根能力起着重要的调节作用。铵态氮含量越高,阻碍植物组织的木质化,从而玻璃化苗产生,MS培养基中铵盐含量高, $B_5$  铵含量较低。试验中,在低浓度的铵盐培养基中,即  $1/2B_5 + 0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  IBA 处理中,“赤霞珠”葡萄试管苗生长效果最好,与苏娟<sup>[2]</sup>的研究结果一致。

石磊利等<sup>[3]</sup>研究表明,在葡萄组培的过程中发现透气性良好,组培苗生长健壮,没有玻璃化苗的出现。陈国菊等<sup>[4]</sup>指出,保持培养容器气体和外界交换畅通是获取健壮组培苗的前提之一,在组织培养过程中,密闭的封口材料影响组培玻璃苗的形成。袁惠君等<sup>[5]</sup>提出,改善培养材料的通气状况,减少培养容器中的湿度和有害气体的积累,利于植株生长。该研究发现,适当增强光照强度,增加培养容器的透气性,有利于“赤霞珠”葡萄试管苗的生长,形成健壮试管苗,提高“赤霞珠”试管苗的移栽成活率。这与李铁军等<sup>[6]</sup>的研究结果类似。

## 参考文献

- [1] 李琰,张存莉.不同培养基对杜仲愈伤组织诱导和生长的影响[J].西北林学院学报,2003,18(3):37-39.
- [2] 苏娟.酿酒葡萄“爱格丽”组织培养基工厂化育苗初探[D].杨凌:西北农林科技大学,2010.
- [3] 石磊利,马新华,李亚玲,等.影响葡萄组培苗玻璃化的环境因素试验[J].新疆农垦科技,2000(6):21-22.
- [4] 陈国菊,雷建军.芥菜试管苗玻璃化的控制[J].西南农业大学学报,1992,14(3):253.
- [5] 袁惠君,宋占午,杨红,等.草莓试管苗与土培苗气孔形态和气孔密度的比较[J].兰州理工大学学报,2004,30(5):79-80.
- [6] 李铁军,康美兰,于丹,等.几种因素对悬浮培养人参细胞生长和皂苷积累的影响[J].中国中药杂志,2013,23(38):4047-4051.

## Optimization of Tissue Culture and Rapid Propagation of ‘Cabernet Sauvignon’ Grape

XU Meilong<sup>1,2</sup>, LIU Jing<sup>1,2</sup>, WANG Qiaozhen<sup>1,2</sup>, YUAN Ting<sup>1,2</sup>

(1. Ningxia Forestry Institute Co. Ltd., Yinchuan, Ningxia 750004; 2. The National Center of Research and Engineering Technology of Economic Forest Tree Speedy Propagation, Yinchuan, Ningxia 750004)

DOI:10.11937/bfyy.201622030

# 大白菜抗根肿病基因 *Crr3* 的 PCR 快速检测与种质资源筛选

孙朝辉<sup>1</sup>, 马安峰<sup>1</sup>, 程 斐<sup>1</sup>, 曹丹丹<sup>1</sup>, 任平平<sup>1</sup>, 高建伟<sup>2</sup>

(1. 青岛农业大学 园艺学院, 山东 青岛 266109; 2. 山东省农业科学院 蔬菜花卉研究所, 山东 济南 250100)

**摘 要:**以抗根肿病大白菜自交系‘YM-7’和感病自交系“冠 291”及其杂交  $F_1$ 、 $F_2$  代和 24 份国内外引进的大白菜种质资源为试材, 采用人工接种和分子标记方法, 研究了 2 对与抗根肿病基因 *Crr3* 紧密连锁分子标记的稳定性及 24 份新材料中 *Crr3* 基因的情况。结果表明: 引物 OPC11-2S 在‘YM-7’中扩增出 1 条 1.3 kb 片段, 在“冠 291”中扩增出 1 条 1.0 kb 片段, 在其  $F_1$  代中同时扩增出 1.3 kb 和 1.0 kb 的片段, 该分子标记在  $F_2$  代中的鉴定结果与人工接种鉴定结果一致, 利用引物 OPC11-2S 能准确标记出大白菜种质资源中 *Crr3* 基因, 而且能够区分出 *Crr3* 基因的纯合性和杂合性, 共选出 2 份含有杂合 *Crr3* 基因的新种质资源。

**关键词:**大白菜; 根肿病; *Crr3* 基因; 分子标记; 种质资源

**中图分类号:**S 634.102.4 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2016)22-0120-04

大白菜根肿病是由芸薹根肿菌 (*Plasmodiophora brassicae* Woron.) 侵染引起的土传性病害, 严重危害十字花科蔬菜的生产<sup>[1]</sup>。大白菜根肿病最早于 1737 年在英国地中海西岸和欧洲南部发现, 目前世界范围内均有分布, 在我国云南、四川、山东等地大白菜根肿病发生面积已经超过种植面积的 65%, 部分田块的损失超过了 50%, 严重制约了大白菜的生产<sup>[2]</sup>。实践证明, 培育抗根肿病品种是防治大白菜根肿病的重要措施。目前已鉴定出 8 个抗根肿病基因位点, 包括位于 A03 染色体上的 *CRa*, *CRb*, *CRk* 和 *Crr3*, 以及分别位于 A08, A01, A06, A02 染色体上的 *Crr1*, *Crr2*, *Crr4* 和 *CRC*<sup>[3-7]</sup>。*Crr3* 是

一个重要的抗根肿病基因, 但目前国内对其研究报道较少。该研究利用抗根肿病纯合系‘YM-7’、感病纯合系“冠 291”及其杂交  $F_1$  代对已发表的 2 对紧密连锁分子标记 OPC11-1S 和 OPC11-2S<sup>[5]</sup> 进行验证, 以期筛选出稳定准确的分子标记方法, 并利用分子标记的方法对大白菜种质资源进行筛选, 以期获得含有抗性基因 *Crr3* 的种质资源, 从而为抗性基因 *Crr3* 的研究以及抗根肿病的大白菜品种培育提供理论依据和种质资源基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

抗根肿病纯合系‘YM-7’、感病纯合系“冠 291”“YM-7×冠 291”杂交  $F_1$  代,  $F_1$  代自交得到  $F_2$  代。国内外引进大白菜种质资源 24 份, 其中 8 份为国外种子公司正在测试尚未推广的新组合。每个自交系和品种选取最典型的生长良好的单株进行测试, 大白菜育种材料品种信息见表 1。

接种所用根肿菌病根采自青岛崂山地区发病严重的大白菜田块。试验所用的引物(表 2)和试剂购买于生

**第一作者简介:**孙朝辉(1968-), 女, 硕士, 副教授, 研究方向为植物营养的基因型差异与育种。E-mail: zhsun163@163.com.

**责任作者:**程斐(1969-), 男, 博士, 副教授, 研究方向为十字花科蔬菜杂种优势利用。E-mail: chengfei246246@163.com.

**基金项目:**山东省良种工程资助项目(鲁科字[2014]96 号); 山东省现代农业产业技术体系资助项目(SDAIT-02-022-01)。

**收稿日期:**2016-07-25

**Abstract:** Wine grape ‘Cabernet Sauvignon’ was used as test material, tissue culture method was used, the effect of different basic culture medium with different concentration of IBA combination and different culture containers on ‘Cabernet Sauvignon’ grape growth was studied, in order to enhance the growth potential of ‘Cabernet Sauvignon’ grape *in vitro* and improve the survival rate of transplanting. The results showed that the  $1/2B_5$  containing  $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  IBA +  $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  sucrose +  $7 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  agar +  $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  activated carbon was suitable for ‘Cabernet Sauvignon’ grape *in vitro* culture. ‘Cabernet Sauvignon’ grape seedlings grew strongly in the bottle with breathable film diameter of 3.0 cm and light transmission rate 90%. The transplanting survival rate was the highest 96.67%.

**Keywords:** wine grape; tissue culture; optimization of culture conditions