

宿晓红葡萄单芽茎段组织培养研究

吴伟民, 袁 骥, 钱亚明, 赵密珍, 王壮伟

(江苏省农业科学院园艺研究所, 江苏南京 210014)

摘要: 分别以宿晓红葡萄冬季休眠枝水培新梢和夏季新梢的单芽茎段为外植体, 比较了两种外植体离体培养时的污染率、芽萌发率和生根率差异, 并对萌发和生根培养基进行了筛选。结果表明, 适宜的外植体是冬季休眠枝水培新梢单芽茎段, 其污染率低于夏季新梢单芽茎段外植体, 芽萌发率高于夏季新梢单芽茎段外植体, 生根率两者无差异; 筛选出适宜芽萌发培养基 $1/2MS + 0.5 \text{ mg/L } 6\text{-BA} + 0.5 \text{ mg/L IAA} + 30 \text{ g/L 蔗糖} + 7 \text{ g/L 琼脂}$, 生根培养基 $1/2MS + 1 \text{ mg/L IBA} + 0.05 \text{ mg/L IAA} + 20 \text{ g/L 蔗糖} + 7 \text{ g/L 琼脂}$ 。

关键词: 葡萄; 宿晓红; 单芽茎段; 离体培养

中图分类号: S663.104+.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1002-1302(2007)05-0098-03

宿晓红葡萄 (*Vitis amurensis* cv. *suqianensis*)^[1] 是江苏省宿迁市的一个古老酿酒品种, 栽培已达 400 多年。经中国科学院植物研究所等单位的考察鉴定, 该品种为宿迁市特有, 且野生性状明显。黄非等^[2] 对宿晓红生物学特性研究表明, 该品种具有较强的抗逆性和适应性, 抗寒性和抗病虫性均较强, 抗葡萄霜霉病。20 世纪 50~80 年代, 宿晓红葡萄在宿迁地区曾规模化栽培, 并作为原料酿制出优质“马陵山”牌红葡萄酒, 多次荣获国内国际奖项, 深受国内外消费者欢迎。然而由于种种原因, 宿晓红葡萄的栽培和利用逐渐减少, 目前仅存数株植株, 已成为濒危植物。近年来, 随着葡萄酒消费市场空间的增大, 宿迁市政府提出了再次利用和发展宿晓红葡萄的规划, 需要大量优质种苗。因此很有必要保存好宿晓红葡萄种质资源, 并繁殖出供大面积生产应用的优质种苗。

葡萄种苗繁殖的方法有扦插、压条、嫁接和组织培养, 但具野生性状的宿晓红葡萄自然扦插生根率明显低于其他栽培品种^[2], 与多数野生种葡萄扦插生根困难相似^[3]。压条和嫁接虽可用于宿晓红葡萄的种苗繁殖^[3], 但现阶段由于受母本植株数量的限制, 很难在短时期内获得大量种苗。组织培养因在葡萄种质资源的保存和迅速扩大繁殖等方面有优

势而被广泛应用^[4]。在前人的研究中, 无论是鲜食葡萄、野生葡萄, 还是酿酒葡萄, 带芽茎段是使用较多且效果较好的外植体材料^[4-6]。目前, 关于宿晓红葡萄组织培养的研究尚无报道, 本研究以该品种不同来源的单芽茎段为外植体, 对其离体培养时芽萌发和生根的差异进行了比较, 对基本培养基和激素组成进行了筛选, 旨在为宿晓红葡萄种质资源的保存和离体快繁技术体系建立奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

宿晓红葡萄植株种植于宿迁市晓店镇, 2 月份采集冬季休眠枝, 7 月份采集夏季半木质化新梢, 立即保湿带回实验室, 用于水培及外植体的制备。

1.2 冬季休眠枝的水培

将冬季休眠枝用自来水冲洗干净后剪成双芽枝段, 在组培室内水培, 40 d 时随机调查 60 个双芽枝段, 统计休眠枝芽萌发率。

1.3 单芽茎段外植体制备

将夏季半木质化去叶新梢用自来水冲洗干净, 和冬枝水培形成的半木质化去叶新梢均剪成 5~6 cm 长枝段, 用 70% 酒精消毒 40 s, 0.1% 升汞消毒 8 min, 无菌水洗涤 3~4 次, 每次 3~5 min, 无菌滤纸吸干, 切割成长度为 0.5~1 cm 的单芽茎段作为外植体。

1.4 外植体表面灭菌效果比较

将两种单芽茎段外植体接种在 $1/2MS + 1 \text{ mg/L } 6\text{-BA} + 30 \text{ g/L 蔗糖} + 7 \text{ g/L 琼脂}$ 的培养基上, 每个 100 ml 三角瓶接种 5 个单芽茎段, 各接种 10 瓶, 重

收稿日期: 2007-03-22

基金项目: 江苏省科技成果示范推广项目 (编号: BC2005235)。

作者简介: 吴伟民 (1967—), 男, 江苏苏州人, 硕士, 副研究员, 主要从事浆果类果树育种与栽培技术研究。Tel: (025) 84390219; E-mail: 5wm@163.com。

复2次,1周后统计污染率。

1.5 单芽茎段离体培养芽萌发诱导培养基的筛选

基本培养基和激素组成分别为:(1) MS + 1 mg/L 6-BA;(2) 1/2MS + 1 mg/L 6-BA;(3) 1/2MS + 1 mg/L 6-BA + 0.5 mg/L IAA;(4) 1/2MS + 1 mg/L 6-BA + 0.1 mg/L IAA;(5) 1/2MS + 0.5 mg/L 6-BA + 0.5 mg/L IAA;(6) 1/2MS + 200 mg/L KCl + 0.5 mg/L 6-BA + 0.5 mg/L IAA。所有培养基均附加 30 g/L 蔗糖和 7 g/L 琼脂,pH 值 5.8。接种培养 25 d 后观察单芽茎段生长发育状况,统计芽萌发率,筛选适宜的芽萌发诱导培养基。

1.6 根诱导培养基的筛选

将在芽萌发诱导培养基上形成的无菌新梢切割成长度为 0.3~0.5 cm 的单芽茎段,接种在根诱导培养基上进行继代培养,供试验的基本培养基和激素组成分别为:A. MS + 1 mg/L IBA;B. 1/2MS + 1 mg/L IBA;C. 1/2MS + 2 mg/L IBA + 0.05 mg/L IAA;D. 1/2MS + 1 mg/L IBA + 0.05 mg/L IAA;E. 1/2MS + 0.5 mg/L IBA + 0.05 mg/L IAA。所有培养基均附加 20 g/L 蔗糖和 7 g/L 琼脂,pH 值 5.8。接种培养 25 d 后观察单芽茎段生长发育状况,统计生根率,筛选适宜的根诱导培养基。

1.7 培养条件

培养室温度 25℃ 左右,光照强度 2 000 lx,光照时间 14 h/d。

2 结果与分析

2.1 冬季休眠枝水培半木质化新梢的获得

双芽枝段扦插在添加 1 mg/L NAA 的水溶液中培养 1 周后芽开始萌动,10 d 后生出绿叶,15 d 时形成新梢(图 1),45 d 左右当新梢长至 15~20 cm 时停止生长。经随机调查,60 个双芽枝段中有 45 个萌发形成新梢,水培芽萌发率达 75%。所形成的新梢处于半木质化状态,可作为本试验材料。

2.2 不同来源单芽茎段外植体接种后污染率的比较

虽然带芽茎段在葡萄组织培养中是理想的外植体,但消毒比较困难,在一定程度上制约了带芽茎段的利用^[7]。本研究采用相同灭菌方法对冬季休眠枝水培新梢与夏季新梢去叶枝段表面消毒,接种 1 周后进行污染率比较,发现前者污染率较低(14%),后者污染率较高(32%),前者明显低于后者。这可能因为前者是用冬季休眠枝经自来水冲

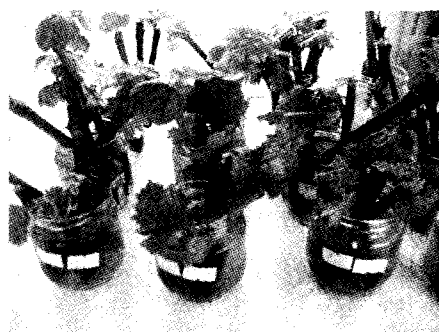


图1 宿晓红葡萄休眠枝水培冬芽萌发形成新梢

洗后再在相对比较清洁的室内环境中生长,带菌量少,而后者采集于外界环境适合杂菌滋生的生长季节,带菌量多。

2.3 不同来源单芽茎段外植体和培养基组成对芽萌发诱导的影响

以 MS、1/2MS 和 1/2MS + 200 mg/L KCl 为基本培养基,以不同浓度的 6-BA 和 IAA 进行激素组合,配置成 6 种培养基,分别对宿晓红葡萄冬季休眠枝水培新梢单芽茎段和夏季新梢单芽茎段进行芽萌发诱导试验,结果表明:在 6 种培养基上,冬季休眠枝水培新梢单芽茎段和夏季新梢单芽茎段培养 25 d 后,均有单芽茎段芽萌发(图 2)。从表 1 可见,在



图2 宿晓红葡萄外植体在适宜的芽诱导培养基上萌发出芽

表 1 不同培养基对宿晓红葡萄两种来源的单芽茎段外植体芽萌发率的影响

培养基 编号	外植体					
	冬季休眠枝水培新梢单芽茎段			夏季新梢单芽茎段		
	接种数 (个)	萌发数 (个)	萌发率 (%)	接种数 (个)	萌发数 (个)	萌发率 (%)
(1)	30	11	36.7	30	5	16.7
(2)	30	17	56.7	30	7	23.3
(3)	30	12	40.0	30	7	23.3
(4)	30	18	60.0	30	9	30.0
(5)	30	20	66.7	30	12	40.0
(6)	30	13	43.3	30	8	26.7

同一种培养基上冬季休眠枝水培新梢单芽茎段芽的萌发率高于夏季新梢。培养基中盐浓度对宿晓红葡萄单芽茎段芽的萌发有影响,以低盐浓度、1/2 MS 为基本培养基效果较好。6-BA 和 IAA 不同浓度间的组合效应表明,单独使用 6-BA 时,芽的萌发率较低,加入 IAA 对芽的萌发有促进作用,但较高浓度 6-BA 对芽的萌发有轻微抑制作用,使用 0.5 mg/L 6-BA 和 0.5 mg/L IAA 组合时,单芽茎段芽的萌发率最高。因此,宿晓红葡萄单芽茎段离体培养芽萌发诱导的适宜培养基是 1/2MS + 0.5 mg/L 6-BA + 0.5 mg/L IAA + 30 g/L 蔗糖 + 7 g/L 琼脂。

2.4 不同培养基对无菌新梢单芽茎段生根的影响

当两种来源的单芽茎段外植体在芽萌发初代培养基上诱导 30 d 时,将形成的无菌新梢切割成长度为 0.3~0.5 cm 的单芽茎段,分别继代接种在根诱导培养基上进行生根培养,基本培养基为 MS 和 1/2MS,附加不同浓度的 IBA 和 IAA,结果表明,两种无菌新梢单芽茎段在附加不同浓度的 IBA、IAA 的 MS 或 1/2MS 培养基上均有单芽茎段生根(图 3),并形成完整植株(图 4),且在同一种培养基上生根率无明显差异。从表 2 可见,MS 和 1/2MS 均可作为根诱导的基本培养基。IBA 对于单芽茎段生根有效,但 IBA 浓度以 1 mg/L 为宜,附加 IAA 可促进根的发生。以 1/2MS 基本培养基和 1 mg/L IBA、0.05 mg/L IAA 的组合生根率最高,可作为宿晓红葡萄无菌新梢单芽茎段根诱导的适宜培养基。



图3 宿晓红葡萄外植体在适宜的根诱导培养基上形成新根

3 讨论

在植物组织培养中,选择合适的外植体是组织培养成功与否的关键。在葡萄组织离体培养种苗繁殖中使用较多且较理想的外植体材料是单芽茎段,但目前葡萄单芽茎段的来源主要是大田葡萄树上夏季生长期的半木质化新梢,也有来源于室内盆栽的



图4 宿晓红葡萄单芽茎段培养形成完整植株

表 2 不同培养基对宿晓红葡萄两种来源的无菌新梢单芽茎段生根率的影响

培养基 编号	冬季休眠枝水培新梢单芽茎段			夏季新梢单芽茎段		
	接种数 (个)	生根数 (个)	生根率 (%)	接种数 (个)	生根数 (个)	生根率 (%)
A	20	5	25	20	6	30
B	20	7	35	20	10	50
C	20	3	15	20	5	25
D	20	12	60	20	10	50
E	20	5	25	20	7	35

葡萄植株^[8],利用葡萄冬季休眠枝水培新梢的较少。本研究仅以宿晓红葡萄为试验品种,比较了冬季休眠枝水培新梢的单芽茎段外植体与夏季新梢的单芽茎段外植体离体培养的效果,结果表明前者在接种污染率和初代培养芽萌发率方面优于后者,可作为宿晓红葡萄离体培养较好的初始外植体材料,同时可通过冷藏或沙藏冬季休眠枝的方法,打破外植体取材的季节性限制。

参考文献:

- [1] 张用宪,张延武,王 军. 宿迁市木本植物资源调查研究[J]. 江苏林业科技,1997,24(3):32-34.
- [2] 黄 非,盛炳成,王 璐. 宿晓红葡萄生物学特性及栽培特点研究[J]. 葡萄栽培与酿酒,1996(3):21-23.
- [3] 张剑侠,王跃进,周 鹏,等. 中国野生葡萄及其杂种在海南的硬枝扦插试验[J]. 中外葡萄与葡萄酒,2000(3):26-28.
- [4] 曹孜义,杨德龙,梁庆丰,等. 内 39 号葡萄株系的离体快繁技术研究[J]. 果树学报,2002,19(6):427-429.
- [5] 张剑侠,王跃进,李沛玲,等. 中国野生葡萄的离体培养与快速繁殖[J]. 园艺学报,2004,31(1):90-93.
- [6] 卢塔山,彭宏祥,张 瑛,等. 优良酿酒葡萄新品种 NW196 组培快繁研究[J]. 西南农业学报,2004,17(4):497-499.
- [7] 易丽鹃,曾幼玲,贺 宾,等. 半无菌表面灭菌获得单芽茎段无菌材料的方法[J]. 新疆农业科学,2005,42(增刊):108-110.
- [8] 吴月燕,陶伟芳. 葡萄离体培养与快速繁殖[J]. 浙江林学院学报,2001,18(2):188-192.