

无核葡萄离体快繁技术研究*

潘学军^{1,2} 张文娥¹ 唐冬梅^{2,3} 骆强伟³

(1 贵州大学农学院 贵阳 550025; 2 西北农林科技大学园艺学院; 3 新疆葡萄瓜果开发研究中心)

近年来,随着人们生活水平的提高,无核葡萄已成为消费的重要趋势和发展方向。但在生产中无核葡萄的主要繁殖方式是扦插,繁殖系数较低,同时生产的苗木常携带病毒,致使无核葡萄质量较差,产量较低,严重阻碍了无核葡萄的种植与推广^[1]。通过组织培养进行葡萄离体快繁,已有许多研究报道^[2-3],但对无核葡萄品种缺乏系统研究。本研究以目前国内主栽的15个无核葡萄品种为材料,旨在建立无核葡萄离体快繁体系,摸索适合各个无核葡萄品种成苗的适宜培养基,为苗木工厂化生产提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

试验于2002—2004年在新疆葡萄瓜果开发研究中心及西北农林科技大学园艺学院组织培养实验室进行,供试无核葡萄品种有无核白、红光无核、红宝石无核、森田尼无核、京早晶、黎明无核、底莱特、赫什无核、大粒红无核、长穗无核白、艾麦纳、爱莫无核、粉红无核、京可晶和红无籽露。

1.2 无菌系的建立

首先采取生长健壮的葡萄新梢,剪成带一个腋芽的单芽茎段,按常规灭菌程序灭菌(流水冲洗2~3小时→75%酒精灭菌30秒→0.1%升汞灭菌6~8分钟→蒸馏水冲洗3~5遍),然后将外植体接种到1/2B5(大量元素是B5的1/2,其他成分均相同)培养基上,培养20天。对在1/2B5培养基上生长不良(腋芽未萌动率大于50%)的品种,重新采取外植体,再接种到1/2MS(大量元素是MS的1/2,其他成分均相同)培养基上,培养20天。培养在培养室内进行,温度(26±2)℃,每日光照12小时,光强2 000 lx。培养时间结束时分别统计污染、褐化情况及腋芽诱导情况。

1.3 继代与生根培养

将长到5 cm左右的初代培养试管苗剪成单芽茎段,分别接种到1/2MS、1/2MS+IAA 0.1 mg/L和1/2B5三种培养基中进行增殖与生根培养。以上每种培养基均加入蔗糖2%,琼脂0.6%,pH值5.6~5.8。每瓶接种1个茎段,每处理接种30瓶。

培养温度25℃,每日光照16小时,光强2 000 lx。培养30天后统计平均生根数和增长节位。

培养基的制作参照王蒂的植物组织培养^[4],初代培养和继代培养参照曹孜义的方法^[5]。

1.4 驯化移栽

于春季将根系生长良好,植株生长健壮的试管苗移栽到盛有珍珠岩的小营养钵中。具体过程分为培养室炼苗、温室炼苗和定植大田三步^[6]。

2 结果与分析

2.1 离体单芽茎段腋芽诱导培养基的筛选

在腋芽诱导初代培养中,供试15个无核葡萄品种间表现出了较大差异。由表1可以看出,1/2B5培养基非常适合用于红宝石无核、黎明无核、红光无核和长穗无核白的腋芽诱导,诱导率在80%以上;京早晶、森田尼无核、赫什无核、大粒红无核、艾麦纳和京可晶等在1/2B5培养基上生长较好,腋芽诱导率≥50%,以此获得的无菌苗能够满足下一步的试验需求;底莱特接种后褐化严重,致使腋芽诱导率仅23.3%;无核白接种后,腋芽未萌动率过高(达77.4%),致使腋芽诱导率仅12.9%;爱莫无核、粉红无核和红无籽露生长也较差,褐化现象严重或腋芽未萌动率高,腋芽诱导率均低(≤30%)。底莱特等5个品种在1/2B5培养基上培养后获得的无菌苗少,不能满足下一步试验的需求,需重新建立无菌系。将底莱特、无核白、爱莫无核、粉红无核和红无籽露5个无核品种的单芽茎段接种到1/2MS培养基上,其腋芽诱导率均高于70%,获得的无菌苗可满足下一步试验需求。

2.2 继代增殖与生根培养基的筛选

将初代培养获得的试管苗剪成单芽茎段接种到增殖及生根培养基上培养30天后,不同培养基的培养效果差异很大。由表2可以看出,综合增殖系数、平均根数、生长状况及成苗率等4个指标,艾麦纳和京可晶适宜在1/2B5培养基上进行增殖及生根培养,增殖系数分别为4.0和5.0,显著高于其他两种

* 贵州省自然科学基金(黔科合J字2006-2043)和贵州大学人才科研项目(贵大人基合字2006-700971301)。

表 1 不同培养基对无核葡萄外植体萌芽和生长的影响

品 种	培养基	接种数 /个	污染情况		褐化情况		腋芽诱导情况			
			污染数 /个	污染率 /%	褐化数 /个	褐化率 /%	未萌芽 数/个	未萌动 率/%	诱导芽 数/个	诱导率 /%
红宝石无核	1/2B5	30	0	0	0	0	0	0	30	100.0Aa
京早晶	1/2B5	31	0	0	0	0	12	38.7	19	61.3Gg
森田尼无核	1/2B5	34	0	0	9	26.5	6	17.6	19	55.9Hh
黎明无核	1/2B5	30	2	6.7	0	0	0	0	28	93.3Bb
红光无核	1/2B5	30	0	0	6	20.0	0	0	24	80.0Dd
赫什无核	1/2B5	33	0	0	12	36.4	0	0	21	63.6Gg
大粒红无核	1/2B5	32	0	0	6	18.8	10	31.2	16	50.0Ii
长穗无核白	1/2B5	31	0	0	0	0	6	19.4	25	80.6Dd
艾麦纳	1/2B5	32	0	0	3	9.4	9	28.1	20	62.5Gg
京可晶	1/2B5	30	2	6.7	6	20.0	3	10.0	19	63.3Gg
底莱特	1/2B5	30	2	6.7	21	70.0	0	0	7	23.3Kk
无核白	1/2B5	31	3	9.7	0	0	24	77.4	4	12.9Ll
爱莫无核	1/2B5	30	0	0	12	40.0	9	30.0	9	30.0Jj
粉红无核	1/2B5	30	2	6.7	3	10.0	18	60.0	7	23.3Kk
红无籽露	1/2B5	30	3	10.0	2	6.7	18	60.0	7	23.3Kk
底莱特	1/2MS	32	2	6.3	0	0	6	18.7	2	75.0Ee
无核白	1/2MS	33	0	0	0	0	4	12.1	3	87.9Cc
爱莫无核	1/2MS	30	0	0	2	6.7	2	6.7	26	86.7Cc
粉红无核	1/2MS	30	0	0	0	0	0	0	30	100.0Aa
红无籽露	1/2MS	30	1	3.3	0	0	8	26.7	21	70.0Ff

注:表中各数值后的大、小写字母分别指 0.01 和 0.05 水平差异。表 2 同。

表 2 不同培养基对无核葡萄芽的增殖及生根的影响

品 种	培养基	增殖 系数	平均根 数/条	成苗率 /%	生长状况		
					叶色	长势	愈伤组织
红宝石无核	1/2B5	2.7 Bb	2.0 Bc	100.0	浅绿	中	少许
	1/2MS	3.0 Bb	3.7 Aa	100.0	黄绿	中	无
	1/2MS+IAA*	3.7 Aa	2.7 Bb	100.0	绿	壮	无
森田尼无核	1/2B5	3.7 Aa	6.7 Aa	100.0	绿	壮	无
	1/2MS	4.0 Aa	4.0 ABb	100.0	绿	壮	无
	1/2MS+IAA	2.0 Bb	1.0 Bc	100.0	浅绿	中	无
黎明无核	1/2B5	3.7 Aa	4.3 Aa	100.0	黄绿	中	少许
	1/2MS	4.0 Aa	2.0 Bb	100.0	绿	壮	无
	1/2MS+IAA	2.0 Bb	0 Bc	50.0	黄绿	中	无
红光无核	1/2B5	2.0 Ab	3.0 Aa	73.3	黄绿	中	少许
	1/2MS	2.0 Ab	1.8 Bb	100.0	浅绿	中	无
	1/2MS+IAA	3.8 Aa	2.7 Aa	100.0	绿	壮	无
长穗无核白	1/2B5	3.0 Bb	3.0 Aa	60.0	浅绿	壮	有
	1/2MS	3.7 Aa	3.0 Aa	100.0	浅绿	壮	无
	1/2MS+IAA	3.0 Bb	0 Bb	46.7	黄绿	弱	无
艾麦纳	1/2B5	4.0 Aa	5.0 Aa	100.0	浅绿	壮	少许玻璃化
	1/2MS	3.0 ABb	3.3 Bb	100.0	浅绿	壮	无
	1/2MS+IAA	2.0 Bb	2.0 Cc	100.0	浅绿	中	无
京可晶	1/2B5	5.0 Aa	4.0 Aa	100.0	黄绿	壮	无
	1/2MS	2.3 Bb	2.0 Bb	100.0	黄绿	中	无
	1/2MS+IAA	1.0 Bb	2.0 Bb	66.7	黄绿	弱	无
底莱特	1/2B5	2.0 Bb	3.0 Aa	40.0	浅绿	中	无
	1/2MS	2.3 Bb	3.0 Aa	60.0	浅绿	中	无
	1/2MS+IAA	3.3 Aa	4.0 Aa	100.0	绿	壮	无
红无籽露	1/2B5	2.0 Bb	1.0 Bb	100.0	黄绿	壮	少许
	1/2MS	3.0 Aa	1.5 Aa	100.0	黄绿	壮	少许
	1/2MS+IAA	0.7 Cc	1.5 Aa	70.0	黄绿	中	无

注:增殖系数=培养增长节位数/接种时节位数;IAA 浓度为 0.1 mg/L。

培养基的培养效果,生根数量较多,成苗率高达100%,且试管苗生长强壮,质量较高;黎明无核、长穗无核白和红无籽露适合在1/2 MS培养基上增殖及生根,增殖系数高,试管苗生长健壮,叶色正常,生根情况较好,成苗率高,且无愈伤组织产生;1/2MS+IAA 0.1 mg/L 适合红宝石无核、红光无核和底莱特的增殖及生根培养,增殖培养所得的试管苗质量优良,增殖系数高;森田尼无核在1/2 MS和1/2 B5培养基中都能生长良好,试管苗质量较高,其增殖系数和生根数都显著高于1/2 MS+IAA 0.1 mg/L培养基。

2.3 试管苗质量对驯化移栽成活率的影响

无核葡萄试管苗移栽成活的关键是幼苗质量,与品种的相关性较小。由表3可知,生长健壮的试管苗移栽成活率明显高于次健壮苗和畸形苗,健壮苗成活率是次健壮苗的近2倍,畸形苗移栽不能成活。茎基部有无愈伤组织严重影响移栽成活率的高低,愈伤组织的存在不仅过多消耗营养,阻碍了根部和地上部的物质交换,而且移栽时易断根。结果显示,无论健壮苗还是次健壮苗,茎基部无愈伤组织的试管苗移栽成活率均明显高于茎基部有愈伤组织的。从试管苗根数、根长、叶片数和叶色等指标来看,无论茎基部有无愈伤组织,根数不少于4条,根长不小于4 cm,叶数不少于5片,叶色浓绿,茎干粗壮的试管苗移栽成活率高。因此,无核葡萄试管苗移栽时,应选根数在5条以上,根长4 cm以上,苗高5 cm以上,至少5片叶片,叶色浓绿,茎干健壮,茎基部无愈伤组织的健壮苗作为移栽材料,这是保证无核葡萄试管苗成功定植大田的首要条件。

表3 无核葡萄试管苗质量对移栽成活率的影响

移栽 苗木 类型	评价指标						移栽成活成活		
	愈伤 组织	根数 /条	根长 /cm	叶数 /片	叶色	茎高 /cm	茎干	株数 /株	率 /%
健 壮	无	≥4	≥4	≥5	浓绿	≥5	粗壮	90	89 98.9
	有	≥4	≥4	≥5	浓绿	≥5	粗壮	90	58 64.4
次健壮	无	1~31	~33~4	淡绿	≥5	细长	43	21	48.8
	有	1~31	~33~4	淡绿	≥5	细长	27	9	33.3
畸 形	玻璃化苗、白化苗							20	0 0

3 讨论与小结

在组织培养中,不同基因型的材料所需要的适宜培养基不同^[1]。在无核葡萄离体单芽茎段初代培养中,底莱特、无核白、爱莫无核、粉红无核和红无籽

露在1/2 MS中萌芽效果好,红宝石无核、黎明无核、红光无核、长穗无核、京早晶、森田尼无核、赫什无核、大粒红无核、艾麦纳和京可晶在1/2B5中萌芽效果好。

在增殖及生根培养中,1/2B5和1/2MS两种培养基均适合森田尼无核的离体快速繁殖;长穗无核白、红无籽露和黎明无核离体快繁适宜的培养基为1/2MS;1/2MS+IAA 0.1 mg/L 适合于红宝石无核、红光无核和底莱特的离体快繁;艾麦纳、京可晶离体快繁的适宜培养基为1/2 B5。以上9个无核葡萄品种在上述培养基上均能一次成苗,且试管苗质量上乘,移栽成活率高。

京早晶和赫什无核离体快繁较适宜的培养基为1/2 B5,无核白、爱莫无核和大粒红无核较适宜的增殖培养基为1/2MS+IAA 0.1 mg/L,粉红无核离体快繁较适宜的培养基为1/2 MS,但这6个无核葡萄品种在上述培养基上的生长情况中等,移栽成活率不是很理想,因此,各自适宜的离体快繁培养基还有待进一步研究。

无核葡萄离体快繁的根本目的是繁育大量高质量的苗木,为无核葡萄的生产服务。因此,在研究无核葡萄快繁技术体系的过程中,必须对试管苗的移栽技术体系进行研究。本研究在前期对葡萄试管苗驯化移栽研究的基础上^[6],重点对试管苗质量与移栽成活率的关系进行了研究,结果发现无核葡萄试管苗质量是制约其成功定植大田的关键因素。

参 考 文 献

- [1] 曹孜义.我国葡萄组织培养研究概况[C].甘肃农业大学学报,1999,34(专辑):62-67
- [2] 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
- [3] 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):327-329
- [4] 王 蒂.植物组织培养[M].北京:中国农业出版社,2004
- [5] 曹孜义.葡萄组织培养译文集[M].兰州:甘肃科学技术出版社,1989
- [6] 潘学军,王跃进,张剑侠,等.葡萄扞挽救苗移栽技术研究[J].西北植物学报,2004,24(6):1077-1082

收稿日期:2006-08-23;修回日期:2006-10-09

作者简介:潘学军(1977-),男,博士,副教授,主要研究方向为果树种质资源与生物技术育种。E-mail:pxjun2050@yahoo.com.cn