

“阳光玫瑰”葡萄嫩茎的组织培养研究^①

农艳丰, 王利园, 李 健

百色学院 农业与食品工程学院, 广西 百色 533000

摘要: 为建立“阳光玫瑰”葡萄嫩茎组织培养体系, 以其嫩茎作为外植体, 进行灭菌时间的确定, 初代培养基、继代培养基、生根培养基的筛选及抗褐化培养, 以期为后续进行种苗脱毒及生产种植提供技术基础. 结果表明: 嫩茎用 0.1% HgCl_2 灭菌 9 min 为最佳处理时间, 萌芽率达到最大, 外植体无污染无死亡; $\text{MS}+1.0 \text{ mg/L KT}+0.1 \text{ mg/L NAA}$ 是嫩芽茎段芽分化最适宜的培养基, 萌芽率达 93.3%, 平均诱导 2 个芽; 通过添加 PVP 有良好的抗褐化效果, 以 2.0 mg/L 浓度为适宜; 继代培养则筛选出 $\text{MS}+1.5 \text{ mg/L KT}+0.1 \text{ mg/L IAA}$ 为无菌芽增殖分化较好的培养基; 生根诱导以 0.3 mg/L NAA 为好.

关键词: “阳光玫瑰”葡萄; 组织培养; 嫩茎

中图分类号: S663.1

文献标志码: A

文章编号: 1000-5471(2021)06-0052-05

“阳光玫瑰”葡萄又名夏依马斯卡特、耀眼玫瑰, 由日本果树实验场安芸津葡萄、柿研究部育成, 欧美杂交种^[1]. 因其风味独特, 果实饱满, 受到消费者追捧, 价格居高不下, 广西自 2012 年引进推广种植后, 种植面积增长迅速^[2]. 我国葡萄生产以鲜食葡萄为主, 占 80% 左右, 葡萄苗木标准化生产是产业发展的基础^[3]. 另外葡萄感染病毒可引起葡萄植株长势衰退、产量降低, 影响葡萄品质^[4]. 而植物组织培养技术可不受季节的限制, 快速繁殖优质的葡萄苗木, 并进行脱毒, 对葡萄产业具有积极的意义. 因此, 建立有效的“阳光玫瑰”鲜食葡萄品种组培快繁体系, 不仅可以满足优质苗木的商业化生产需求, 还能为优质葡萄市场提供技术参考. “阳光玫瑰”葡萄在国内主要的研究方向为推广丰产栽培管理^[5-7]、提高品质^[8-10]及病毒检测^[11]等, 但尚未见有建立组培再生体系的文献报道. 本研究利用植物组织培养技术建立高效的组织培养体系, 旨在获得“阳光玫瑰”葡萄高效再生组培苗, 为后续进行种苗脱毒及种苗生产种植提供技术基础.

1 材料与方法

1.1 试验材料

“阳光玫瑰”葡萄苗, 购买于江苏润易农业有限公司, 种植于百色学院农业与食品工程学院试验基地, 取当年生嫩芽茎段作为试验材料.

1.2 试验方法

1.2.1 外植体灭菌

在天气晴朗的条件下取嫩芽茎段, 切成带腋芽的长约 1.5 cm 左右的茎段, 加入洗衣粉溶液浸泡 3 min, 流水进行冲洗 10 min, 之后转移至超净工作台上进行灭菌. 外植体用 75% 酒精浸泡 20 s 后用无菌水清洗 4 次, 再用 0.1% 升汞(HgCl_2)灭菌(7, 9, 11, 13 min), 无菌水冲洗 4 次. 接种到 $\text{MS}+1.0 \text{ mg/L 6-糠基氨基嘌呤(KT)}+30 \text{ g/L 蔗糖}+7 \text{ g/L 琼脂粉}$ 培养基上, 共 4 个处理, 每个处理 30 个外植体, 3 次重

① 收稿日期: 2020-10-04

基金项目: 广西自然科学基金项目(2018GXNSFBA050026); 广西硕士学位授予单位立项建设授权点项目(桂学位[2018]7号).

作者简介: 农艳丰, 硕士, 讲师, 主要从事植物组织培养及植物资源开发的研究.

通信作者: 李 健, 博士, 讲师.

复. 光照培养, 7 d后记录污染率、萌芽率、死亡率.

污染率=污染的外植体数/总接种外植体数 $\times 100\%$

萌芽率=萌芽外植体数/总接种外植体数 $\times 100\%$

死亡率=死亡外植体数/总接种外植体数 $\times 100\%$

1.2.2 初代培养

将经过预处理及 1.2.1 步骤最佳灭菌处理的外植体接种于培养基 MS+KT(0,1.0,2.0,3.0,4.0 mg/L)+萘乙酸(NAA, 0,0.1,0.3,0.5 mg/L)+蔗糖30 g/L+琼脂粉 7 g/L, 共 8 个处理, 每个处理 30 个外植体, 3 次重复, 光照培养至 30 d, 统计萌发情况.

平均芽数=外植体出芽总数/外植体接种数

1.2.3 抗褐化处理

在 1.2.2 步骤获得的最佳初代培养基中添加聚乙烯吡咯烷酮(PVP, 0,0.5,1.0,1.5,2.0,2.5 g/L)共 6 个梯度进行抗褐化试验处理, 每个处理 30 个外植体, 3 次重复, 光照培养至 30 d, 统计褐化情况.

褐化率=褐化的外植体数/总接种外植体数 $\times 100\%$

1.2.4 继代培养

将初代培养长出的无菌嫩芽茎段, 再切成带单芽的茎段接种于培养基 MS+KT(0,1.0,1.5 mg/L)+吲哚-3-乙酸(IAA, 0,0.1,0.2,0.3 mg/L)+蔗糖 30 g/L+琼脂粉 7 g/L, 共 8 个处理, 每个处理 30 个外植体, 3 次重复, 接种 30 d 后观察芽的诱导与生长情况, 确定继代培养基的植物生长调节剂最佳配比.

平均芽高=外植体出芽的高度总和/外植体出芽总数

1.2.5 生根培养

将继代培养获得的组培苗(约 2 cm 高)接种到生根培养基中, 培养基设置为 NAA(0,0.1,0.3,0.5 mg/L)和吲哚丁酸(IBA, 0,0.1,0.3,0.5 mg/L)共 7 个处理, 每个处理 30 个外植体, 3 次重复, 接种 30 d 后观察生根的诱导与生长情况, 确定最适宜的生根培养基.

生根率=生根外植体数/总接种组培苗数 $\times 100\%$

平均根数=生根总数/接种组培苗数

1.2.6 指标及数据统计

数据使用 excel 和 spss 22.0 进行统计处理分析.

2 结果与分析

2.1 外植体灭菌

升汞(HgCl₂)是常用的外植体灭菌剂, 本试验使用 0.1% HgCl₂ 对外植体进行灭菌, 由表 1 可知, 灭菌 7 min 处理的外植体污染率为 13.33%, 灭菌 9,11,13 min 3 个处理的外植体污染率都为 0. 从萌芽情况来看, 整体萌芽率均高于 80%, 以 7 min 处理的萌芽率最高, 各处理差异有统计学意义. 随着灭菌时间延长, 死亡率上升, 综合考虑污染率、死亡率与萌芽率, 得出 0.1% HgCl₂ 对外植体灭菌处理最佳时间为 9 min.

表 1 0.1%HgCl₂ 不同灭菌时间对嫩芽茎段的灭菌效果

灭菌时间/min	接种数/个	污染率/%	死亡率/%	萌芽率/%
7	30	13.3 a	0 c	93.3 a
9	30	0 b	0 c	90.0 b
11	30	0 b	13.3 b	83.3 c
13	30	0 b	20.0 a	80.0 d

注: 同列小写字母不同表示 $p<0.05$, 差异有统计学意义.

2.2 初代培养

单独使用 KT 和配合使用 NAA 对外植体萌芽的效果, 由表 2 可知, 总体上, 萌芽率均能达到 60%以上. 单独使用 KT 时, 浓度为 1.0 mg/L 时萌芽最多, 萌芽效果最好. 在 1.0 mg/L KT 的基础上, 添加 NAA 的处理中, 以添加 0.1 mg/L 的处理萌芽率最高, 为 93.3%, 平均出芽数能达到 2.0 个. 在试验观察中发现, 配合使用 NAA 的处理, 外植体萌芽早于不使用 NAA, 在培养 5 d 时腋芽开始有萌发伸长迹象,

11 d 已出芽并张叶, 芽粗壮. 分析得出, MS+1.0 mg/L KT+0.1 mg/L NAA 是嫩芽茎段芽分化最适宜的培养基.

表 2 不同 KT 和 NAA 配比对外植体萌芽的诱导效果

KT/(mg · L ⁻¹)	NAA/(mg · L ⁻¹)	接种外植体数/个	萌芽外植体数/个	萌芽率/%	平均芽数/个
0	0	30	16	53.3m	1.3 e
1.0	0	30	27	90.0 b	1.6 bc
2.0	0	30	19	63.3 f	1.4 de
3.0	0	30	21	70.0 d	1.3 e
4.0	0	30	20	66.7 e	1.5 cd
1.0	0.1	30	28	93.3 a	2.0 a
1.0	0.3	30	25	83.3 c	1.7 b
1.0	0.5	30	19	63.3 f	1.7 b

注: 同列小写字母不同表示 $p<0.05$, 差异有统计学意义.

2.3 抗褐化处理

褐化是葡萄组织培养中常见的现象, 是制约葡萄组织培养成功的因素. 研究人员在植物组织培养过程中, 通过添加各种不同的抗褐化剂来抑制或防止褐化. 本试验在前人研究的基础上添加 PVP 作为抗褐化剂, 研究对葡萄嫩芽的抗褐化效果. 试验结果显示: 褐化率最低可以控制到 13.3%, 除了 2.0 mg/L 和 2.5 mg/L 处理褐化率相同外, 其他处理组差异有统计学意义. 添加 PVP 与对照组相比, 褐化率明显下降, 在 0.5~2.0 mg/L 范围内, 随着 PVP 浓度的增加, 褐化率逐渐降低. 综合结果表明, PVP 对“阳光玫瑰”葡萄嫩芽培养有良好的抗褐化效果, 以添加 2.0 mg/L PVP 效果为最好(表 3).

表 3 不同质量浓度 PVP 对外植体培养的抗褐化效果

PVP/(g · L ⁻¹)	接种总数/个	褐化数/个	褐化率/%
0	30	25	83.3 a
0.5	30	18	60.0 b
1.0	30	14	46.7 c
1.5	30	10	33.3 d
2.0	30	4	13.3 e
2.5	30	4	13.3 e

注: 同列小写字母不同表示 $p<0.05$, 差异有统计学意义.

2.4 继代培养

以 KT 和 IAA 配比探讨对无菌苗进行继代培养的影响, 由表 4 可知, 两种激素配比培养诱导的平均芽数均能达到 2 个以上, 比单独使用 KT 的效果要好. 除 KT 为 1.0 mg/L, IAA 为 0.2 mg/L 组外, 其余各配比处理间平均芽数差异无统计学意义. 而在平均芽高指标中, 添加 1.5 mg/L KT 的处理比 1.0 mg/L KT 的要高, 因此认为细胞分裂素对芽的伸长有较好的促进作用. 无菌芽培养 5 d 时, 7 个处理的腋芽开始启动, 但无明显变化; 培养至 15 d 时观察, 发现 KT 和 IAA 配比处理的腋芽伸长并已长出叶片, 叶片明显比较绿; 培养至 30 d 时观察到添加 1.5 mg/L KT 的 3 个处理无菌苗增殖分化出的芽比较粗壮并且高度比其他处理要高. 综合分析无菌苗长势与腋芽萌芽数, 筛选出 MS+1.5 mg/L KT+0.1 mg/L IAA 为无菌芽继代培养增殖分化较好的培养基.

表 4 不同 KT 及 IAA 配比对无菌芽继代培养的效果

KT/(mg · L ⁻¹)	IAA/(mg · L ⁻¹)	接种外植体数/个	平均芽数/个	平均芽高/cm
0	0	30	1.6 d	1.8 d
1.0	0	30	1.8 c	2.2 c
1.0	0.1	30	2.3 b	2.6 a
1.0	0.2	30	2.6 a	2.4 b
1.0	0.3	30	2.2 b	2.4 b
1.5	0.1	30	2.4 ab	2.7 a
1.5	0.2	30	2.2 b	2.7 a
1.5	0.3	30	2.2 b	2.6 a

注: 同列小写字母不同表示 $p<0.05$, 差异有统计学意义.

2.5 生根培养

以低浓度的生长素诱导葡萄组培苗生根, 结果显示: 0.1~0.5 mg/L 范围内的生长素诱导葡萄组培苗生根效果明显, 均能达到 100%, 平均根数达到 5 根以上. 相比来说, NAA 处理诱导的平均根数比 IBA 处理的平均根数多, 当 NAA 为 0.3 mg/L 时, 平均根数与其他组相比, 差异有统计学意义, 为 7.1 根(表 5). 培养过程中发现, 组培苗根都偏白, 细长. 培养 4 d 即开始启动生根, 13 d 达到根数高峰. 综合对比, 组培苗生根诱导以 0.3 mg/L NAA 为最好.

表 5 不同生长素对组培苗生根的诱导效果

NAA/(mg · L ⁻¹)	IBA/(mg · L ⁻¹)	接种总数/个	生根数/个	生根率/%	平均根数/条
0	0	30	25	83.3	4.5 f
0.1	0	30	30	100.0	6.5 b
0.3	0	30	30	100.0	7.1 a
0.5	0	30	30	100.0	6.1 c
0	0.1	30	30	100.0	6.2 c
0	0.3	30	30	100.0	5.4 e
0	0.5	30	30	100.0	5.7 d

注: 同列小写字母不同表示 $p<0.05$, 差异有统计学意义.

3 讨论与结论

随着生活质量和消费水平的提高, 优良品种的葡萄更占市场主导地位. “阳光玫瑰”葡萄因其甜度高、口感佳、品质好而受到人们的喜爱. 因此扩大种苗来源及优质脱毒苗成为亟待解决的问题, 建立组织培养技术体系可为其提供技术支撑. 葡萄在组织培养过程中容易褐化, 褐色物质可抑制芽的生长和增殖, 因此在本试验中添加抗褐化剂 PVP, 抗褐化效果明显, 本结果与饶慧云等^[12]的研究结果相似. 不同植物基因型所需植物生长调节剂种类和配比不同. 对于“阳光玫瑰”葡萄培养来说, 细胞分裂素与生长素配合使用在初代和继代中均有良好的诱导和分化效果. “阳光玫瑰”葡萄组培苗较容易生根, 低浓度的生长素即可诱导根的生长和伸长, 粗细效果并不明显. 有研究表明, 在诱导根的增粗方面, 可使用高浓度的糖来诱导^[13], 因此, 下一步可参考该方法深入研究.

本试验以“阳光玫瑰”葡萄嫩茎作为外植体, 进行组培技术的探讨, 确定了嫩茎用 0.1% HgCl₂ 灭菌 9 min 为最佳处理时间, 萌芽率达到最大, 外植体无污染无死亡; MS+1.0 mg/L KT+0.1 mg/L NAA 是嫩芽茎段芽分化最适宜的培养基, 萌芽率达 93.3%, 平均诱导 2 个芽; 通过添加 PVP 有良好的抗褐化效果, 以 2.0 mg/L 为适宜; 继代培养则筛选出 MS+1.5 mg/L KT+0.1 mg/L IAA 为无菌芽增殖分化较好的培养基; 组培苗生根诱导以 0.3 mg/L NAA 为最好. 该结果建立了“阳光玫瑰”葡萄嫩茎组织培养体系, 以为后续进行种苗脱毒及种苗生产种植提供技术基础.

参考文献:

[1] 宋献策, 王世平, 顾巧英, 等. 阳光玫瑰葡萄在上海的引种表现及优质栽培技术 [J]. 中外葡萄与葡萄酒, 2015(4): 48-51.

[2] 王 博, 白 扬, 白先进, 等. 阳光玫瑰葡萄在广西南宁的引种表现及其一年两收栽培技术 [J]. 南方农业学报, 2016, 47(6): 975-979.

[3] 蔡文博, 段 虹, 王 军, 等. 4 个鲜食葡萄品种组培快繁体系的建立 [J]. 核农学报, 2019, 33(2): 248-254.

[4] 李文学, 吕苗苗, 胡丽杰, 等. 宁夏地区葡萄卷叶伴随病毒遗传变异的 PCR-SSCP 分析 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2019, 41(10): 1-10.

[5] 林 茜, 韩晓华, 高营营, 等. 7 种砧木对南宁“阳光玫瑰”葡萄生长及果实品质的影响 [J]. 中国南方果树, 2020, 49(1): 100-104.

[6] 陈湘云, 王先荣, 石雪晖, 等. “阳光玫瑰”葡萄生物学特性及其栽培关键技术 [J]. 湖南农业科学, 2019(8): 70-73.

[7] 白明第, 陆晓英, 吴代东, 等. 云南“阳光玫瑰”葡萄关键栽培技术及发展建议 [J]. 中国南方果树, 2019, 48(5): 116-121.

[8] 王继源,冯 娇,侯旭东,等. 不同果袋对“阳光玫瑰”葡萄香气组分及合成相关基因表达的影响 [J]. 果树学报, 2017, 34(1): 1-11.

[9] 程大伟,祁 帅,陈锦永,等. 不同留穗尖方式对阳光玫瑰葡萄品质的影响 [J]. 中国农业科技导报, 2019, 21(5): 33-40.

[10] 王 莎,程大伟,顾 红,等. 植物生长调节剂对“阳光玫瑰”葡萄果实无核及品质的影响 [J]. 果树学, 2019, 36(12): 1675-1682.

[11] 娄兵海,白先进,宋雅琴,等. “阳光玫瑰”葡萄中主要葡萄病毒病原的检测 [J]. 植物保护学报, 2017, 44(2): 345-346.

[12] 饶慧云,邵祖超,柳海宁,等. 抗褐化剂对葡萄愈伤组织继代培养过程中酚类物质、相关酶及其基因表达的影响 [J]. 植物生理学报, 2015, 51(8): 1322-1330.

[13] 齐向丽,师校欣,杜国强. “红国王”葡萄组织培养快速繁殖 [J]. 分子植物育种, 2020, 18(3): 982-987.

On Tissue Culture of “Shine Muscat” Grape Stems

NONG Yan-feng, WANG Li-yuan, LI Jian

College of Agricultural and Food Engineering, Baise University, Baise Guangxi 533000, China

Abstract: In order to establish the tissue culture system of “*Shine Muscat*” grape, the culture medium, rooting medium and anti-browning culture, for providing a technical basis for the subsequent detoxification of seedlings and production. The results show that the best treatment time was sterilized with 0.1% HgCl_2 for 9 minutes, the germination rate reached the maximum, and the explants had no pollution and death; $\text{MS}+1.0\text{ mg/L KT}+0.1\text{ mg/L NAA}$ was the most suitable medium for bud differentiation, with a germination rate of 93.3%, inducing 2 buds on average. By adding PVP, it has a good anti-browning effect with a concentration of 2.0 mg/L. $\text{MS}+1.5\text{ mg/L KT}+0.1\text{ mg/L IAA}$ was suitable for sterile buds proliferation and differentiation; 0.3 mg/L NAA was suitable for rooting induction.

Key words: “Shine Muscat ” grape; tissue culture; stems

责任编辑 周仁惠