

# 贵妃玫瑰葡萄组培技术探究

苏玲<sup>1,2,3</sup>, 宫磊<sup>1,2,3</sup>, 尹向田<sup>1,2,3</sup>, 杨立英<sup>1,2,3\*</sup>, 杨阳<sup>1,2,3</sup> (1.山东省葡萄研究院, 山东济南 250100; 2.山东省葡萄栽培与精深加工工程技术研究中心, 山东济南 250100; 3.农业部华东都市农业重点实验室, 山东济南 250100)

**摘要** 以贵妃玫瑰葡萄为试材, 研究不同消毒时间、取材部位、外植体大小以及不同浓度植物激素对增殖和生根培养的影响, 优化组培快繁技术, 以期为优良鲜食葡萄品种的快速繁殖提供依据。结果表明, 最适宜的外植体消毒条件是用 0.5% 的次氯酸钠溶液消毒 15 min; 外植体的最佳取材部位为中部茎段; 选用外植体长度和粗度分别为 2~3 cm 和 0.5~0.8 cm 时, 组培快繁的效果最佳; 增殖培养过程中, 最理想的 6-BA 浓度为 1.0 mg/L; 生根培养过程中最适 IBA 浓度为 0.5 mg/L。

**关键词** 葡萄; 组织培养; 快繁; 技术

中图分类号 S663.1 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2020)08-0051-03

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2020.08.013



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

## Study on Tissue Culture Technology of the Guifeimeigui Grape

SU Ling<sup>1,2,3</sup>, GONG Lei<sup>1,2,3</sup>, YIN Xiang-tian<sup>1,2,3</sup> et al (1. Shandong Academy of Grape, Jinan, Shandong 250100; 2. Shandong Engineering Research Center for Grape Cultivation and Deep-processing, Jinan, Shandong 250100; 3. Key Laboratory of East China Urban Agriculture, Ministry of Agriculture, Jinan, Shandong 250100)

**Abstract** In this experiment, taking the Guifeimeigui grape as the test material, the effects of different disinfection time, sampling position, explants size and different concentrations of plant hormones on the proliferation and rooting culture were studied. Tissue culture and rapid propagation technology were optimized to provide reference for the rapid propagation of excellent fresh grape varieties. The results showed that the best sterilizing condition was to sterilize the explants with 0.5% sodium hypochlorite solution for 15 minutes; the best sampling parts of explants were the middle stem segments; when the length and thickness of explant were 2~3 cm and 0.5~0.8 cm respectively, the effect of tissue culture and rapid propagation was the best. During the proliferation culture, the optimal concentration of 6-BA was 1.0 mg/L; the optimum IBA concentration during rooting culture was 0.5 mg/L.

**Key words** Grape; Tissue culture; Rapid propagation; Technology

葡萄作为重要的经济类果树作物之一, 具有悠久的栽培历史和丰富多样的品种, 是世界第二大水果<sup>[1-2]</sup>。我国作为世界葡萄 (*Vitis vinifera* L.) 的生产大国之一, 葡萄的栽培面积和产量均居世界前列。由于葡萄的遗传背景相对复杂, 应用传统的育种方式周期长, 且新品种的培育较困难; 通过扦插或嫁接等方法进行无性繁殖育苗, 受到区域、季节变化的局限, 周期也较长且易积累病害<sup>[3]</sup>。多年来, 利用组织培养繁育优良苗木品种一直是葡萄育种的研究重点<sup>[4-5]</sup>。植物组织培养技术能够不受季节限制, 快速繁殖优质葡萄苗木, 同时降低成本。因此, 建立有效的鲜食葡萄品种组培快繁体系, 不仅可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。

贵妃玫瑰, 欧亚种, 原产我国。该品种穗形整齐, 果皮薄, 无涩味, 果肉质地软, 充分成熟有淡玫瑰香味, 品质中上, 产量高, 具有较好的品种特性<sup>[6]</sup>。近年来, 葡萄设施栽培壮大, 该品种也是一个适合设施栽培的早熟品种。快速扩繁该品种, 有助于获得较高的经济价值。由于传统繁殖方式的局限性, 需要通过组织离体培养的方法来实现其快速繁殖。植物组织培养作为育种技术, 在育种、资源保存和生产等方面已经得到广泛应用<sup>[7]</sup>。虽然葡萄组培快繁应用广泛, 但在贵

妃玫瑰葡萄上的研究和应用报道很少。该研究以贵妃玫瑰葡萄的嫩枝为研究对象, 以 MS 作为基本培养基, 对贵妃玫瑰组培技术条件进行筛选, 从而获得合适的培养体系, 为利用组培体系进行快速育苗研究提供技术支持。

## 1 材料与方法

**1.1 试验材料** 2018 年 6 月上旬, 取自山东省农业科学院济阳试验基地葡萄园贵妃玫瑰葡萄的当年生新梢。

### 1.2 方法

**1.2.1 培养基及配制。** 基本培养基采用 MS 和 1/2MS, 添加 6-BA 和 IBA, 调整 pH 至 5.8~6.0, 121 °C 高压灭菌 20 min。

**1.2.2 试材消毒。** 选取半木质化的枝条茎段为外植体, 剪掉病、虫、长势弱的枝和叶片, 首先用流水冲洗 2 h 后, 用 75% 酒精消毒 10 s, 无菌水冲洗 2~3 次, 再用 0.5% 次氯酸钠分别消毒 5、10、15 和 20 min, 无菌水冲洗 4~5 遍, 最后用灭菌的滤纸吸去表面多余水分, 分别接种于 MS 培养基上, 每个处理接种 20 个茎段, 重复 3 次。设置如下培养条件: 光照时间 16 h/d, 光照强度 2 000 Lx, 温度 25 °C, 空气相对湿度 40%~60%。并在 1 个月后统计芽的成活率。

**1.2.3 单芽茎段的处理。** 外植体消毒后, 分别选取处于顶梢、中上部和基部的单芽茎段各 30 个接种于 MS 培养基上, 重复 3 次, 并在 1 个月后统计芽的成活率。

选择消毒外植体茎, 将其剪成长度为 2~3、3~4、4~5 cm, 再按粗细分为直径小于 0.5 cm、0.5~0.8 cm、大于 0.8 cm 的单芽茎段, 分别接种于 MS 培养基上, 每个处理接种 30 个茎段, 重复 3 次。观察其生长情况, 并在 1 个月后统计芽的萌发率。

**基金项目** 山东省重点研发计划(2017CXGC0210); 山东省农科院农业科技创新工程(CXGC2016DOI, CXGC2018E17, CXGC2018F04); 济南试验站葡萄标准化栽培模式建立。

**作者简介** 苏玲(1988—), 女, 山东莱芜人, 农艺师, 博士, 从事果树分子生物学与生物技术研究。\*通信作者, 高级农艺师, 从事葡萄栽培与生理研究。

**收稿日期** 2019-09-02

**1.2.4 增殖和生根培养基的选择。**选择培养获得的无菌单芽茎段芽(长度1.5cm左右),分别接种于添加6-BA和IAA 2种植物激素的增殖培养基中,并设定3个浓度梯度的6-BA,分别为0.5、1.0和2.0 mg/L,IAA浓度为0.1 mg/L。每种培养基中接种20个茎段,重复3次,1个月后观察并统计生长和增殖情况。

将长势健壮的无菌组培苗接种于含有不同浓度(0、0.2、0.5和1.0 mg/L)IBA的1/2MS培养基上,1个月后观察并统计生根率和生根情况。

**1.2.5 炼苗和移栽。**待组培苗长至5~7 cm,带有5片左右叶片时,将幼苗连瓶子一起置于20~28℃的温室中炼苗2~3 d,再去掉瓶塞,然后在自然光下炼苗4~7 d(需从室内到室外慢慢过渡),当试管苗不再萎蔫即可出瓶。用镊子小心夹取植株,用干净的温水洗净组织培养苗植株根部的培养基,移栽于准备好的基质中,控制移栽时空气湿度95%以上、温度25℃左右。

## 2 结果与分析

**2.1 消毒时间对成活率的影响** 不同消毒时间处理下,统计外植体的成活率、污染率和褐死率。结果显示,消毒15 min时,外植体成活率最高,达到86.67%,污染率和褐死率分别为5.00%和8.33%(图1)。表1还表明,随着消毒时间的延长,外植体的污染率逐渐降低,而褐死率逐渐升高。综上表明,消毒15 min时,更适宜于外植体的成活。

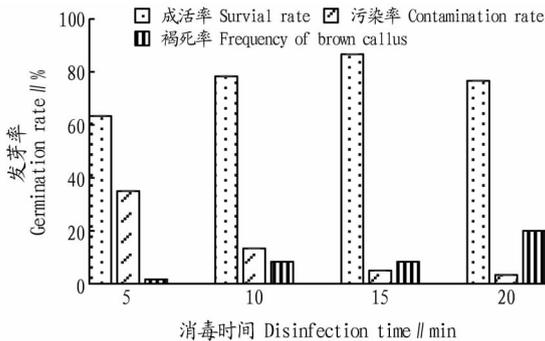


图1 不同消毒时间外植体的成活率、污染率和褐死率

Fig.1 Survival rate, pollution rate and frequency of brown callus of explants at different disinfection times

**2.2 取材部位对发芽率的影响** 分别对取于顶梢、中部和基部茎段的外植体发芽率进行统计分析,发现基部部位的外植体发芽率达63.33%,中部部位和顶梢的外植体发芽率分别达87.78%和53.33%(图2)。结果表明,处于中部部位的外植体发芽率最高。因此,外植体的取材部位为中部茎段时最有利于贵妃玫瑰葡萄的离体组织培养。

**2.3 外植体长度和粗度对发芽率的影响** 将不同外植体长度在2~5 cm的茎段接种后统计发芽率,结果如图3所示,当外植体长度在2~<3、3~<4、4~<5 cm时,萌芽率分别为90.00%、77.78%和67.78%。由此表明,随着外植体长度的增加,其发芽率降低。上述结果表明,外植体长度处于2~<3 cm时发芽最好。

同时对处于不同粗度外植体的发芽率也进行了统计。

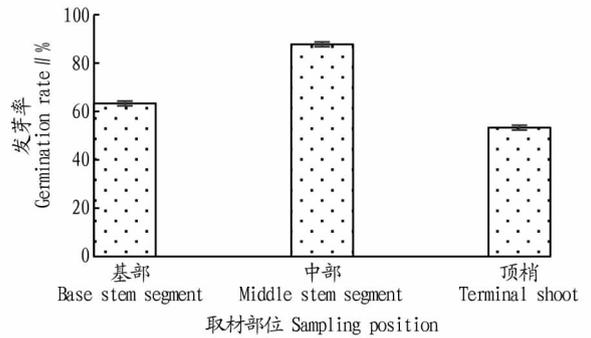


图2 不同取材部位外植体的发芽率

Fig.2 Germination rate of explants from different parts

发现小于0.5、0.5~0.8 cm、大于0.8 cm的外植体的发芽率分别是66.67%、88.89%和62.22%(图4)。处于中间粗度的外植体发芽率明显高于另2种粗度。由此说明,当外植体的粗度处于0.5~0.8 cm时,其发芽率最高。

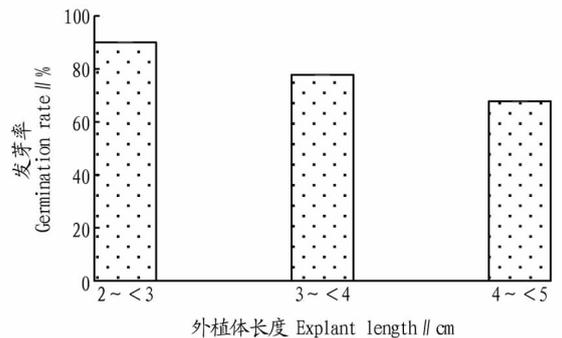


图3 不同长度和粗度外植体的发芽率

Fig.3 Germination rate of explants of different lengths

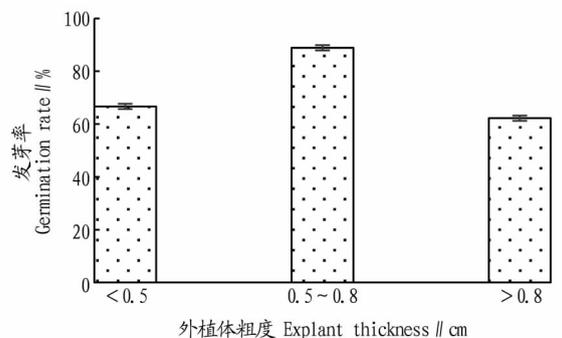


图4 不同粗度外植体的发芽率

Fig.4 Germination rate of different thickness explants

**2.4 激素6-BA浓度影响贵妃玫瑰增殖的分析** 将单芽茎段芽分别接种于含不同浓度6-BA的3种增殖培养基(MS+6-BA 0.5 mg/L+IAA 0.1 mg/L, MS+6-BA 1.0 mg/L+IAA 0.1 mg/L, MS+6-BA 2.0 mg/L+IAA 0.1 mg/L)中,40 d左右统计其增殖系数,结果如图5所示。6-BA浓度为0.5、1.0和2.0 mg/L时,贵妃玫瑰的增殖系数分别是1.85、2.92和2.98,由此表明,随着6-BA浓度的增加,贵妃玫瑰的增殖率呈上升趋势,但浓度为1.0和2.0 mg/L时,其增殖系数相差较小,且前者植株长势的整齐度高于后者。因此,建议选择1.0 mg/L 6-BA的浓度用于贵妃玫瑰的增殖培养。

**2.5 激素IBA浓度对贵妃玫瑰生根培养的影响** 以贵妃玫

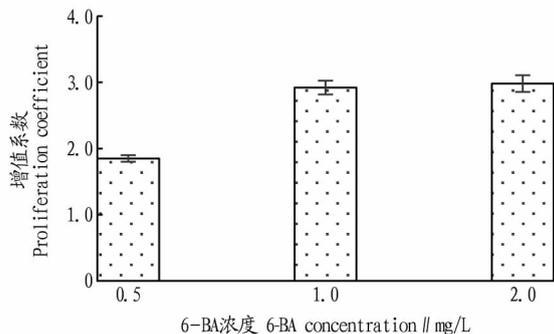


图5 不同6-BA浓度下贵妃玫瑰的增殖系数

Fig.5 Proliferation coefficient of Guifeimeigui under different 6-BA concentrations

瑰无菌组培苗为材料,将其接种于含有不同浓度 IBA 的生根培养基(A:1/2MS,B:1/2MS+IBA 0.2 mg/L,C:1/2MS+IBA

0.5 mg/L,D:1/2MS+IBA 1.0 mg/L)中,探讨不同浓度 IBA 对贵妃玫瑰组培苗生根的影响。由表 1 和图 6 可知,生根培养基中加入 IBA 后,组培苗的生根率得到提高。当 IBA 浓度为 0.2 mg/L,组培苗的叶片和根的生长情况较好,且生根率也较高,当 IBA 浓度为 0.5 mg/L 时,组培苗达到最优生长和生根状况。当 IBA 浓度达到 1.0 mg/L 时,虽然叶片和根的生长情况较好,但是生根率明显下降。由此表明,最适宜贵妃玫瑰生根的 IBA 浓度为 0.5 mg/L。

### 3 讨论

外植体的生长发育情况及其消毒时间的长短,对组培繁育有很大影响<sup>[8-9]</sup>。外植体消毒作为组织培养的第一步,具有重要作用,不同的消毒处理时间对发芽率尤为重要<sup>[10]</sup>。该试验中,0.5%次氯酸钠消毒 15 min,对无菌培养具有良好的促进作用。外植体的生长情况也取决于取材的时间。取

表1 贵妃玫瑰葡萄在不同培养基上的继代培养

Table 1 Subculture of Guifeimeigui grape on different media

培养基类型 Medium type	每株叶片数 Number of leaves per plant // 片	株高 Plant height // cm	每株根数 Number of roots per plant // 条	平均根长 Average root length // cm	生根率 Rooting rate // %
A	3.22±0.62	3.06±0.52	2.53±0.55	1.86±0.92	70.33±0.11
B	4.18±0.69	3.87±0.64	2.85±0.87	1.89±1.23	83.33±0.15
C	5.06±0.82	4.58±0.95	3.27±1.33	2.02±1.36	90.33±0.17
D	5.12±0.68	4.62±1.24	3.06±1.41	1.79±1.14	76.67±0.13

材时间过早,外植体的半木质化程度低,消毒时容易发生褐化;取材时间过晚,雨季天气来临,病菌种类变多且繁殖活跃,新梢的增殖减慢,不利于快繁体系的建立。

营养物质直接影响组培苗的生长状况<sup>[11]</sup>,因此培养基组分对增殖和生根培养的作用尤为显著。植物激素作为调控植物生长的活性物质,在细胞分裂与伸长、组织与器官分化、开花与结实、成熟与衰老、休眠与萌发以及离体组织培养等方面都具有重要作用<sup>[12-14]</sup>。研究表明,外源和内源激素能够相互平衡,更好地调节植物生长和发育,由此在组培过程中有必要在培养基中添加一定量的植物激素来调控生长和分化<sup>[15]</sup>。该试验的增殖和生根过程中,分别选用 MS 和 1/2MS 作为基础培养基,分别选用 6-BA 和 IBA 作为生长调节剂。研究发现,加入 1.0 mg/L 6-BA 时,外植体生长状况良好,但当 6-BA 浓度增大到 2.0 mg/L 时,增殖培养的外植体虽然增殖系数较好,但是易出现畸形,添加活性炭也可以明显减轻褐变,有利于外植体生长,浓度一般为 0.1%~0.3%<sup>[16]</sup>。研究表明,单独使用 IBA 可促进组培苗的生根。白瑞兴等<sup>[17]</sup>选用大量元素减半的 B5 培养基中添加 0.2~0.5 mg/L IAA,成苗率高且植株生长健壮。该试验中,加入不同浓度的 IBA 均可促进组培苗的生根,且浓度为 0.5 mg/L 最佳。另外,齐永顺等<sup>[18-19]</sup>研究表明,内源激素水平对植物生根发育也具有重要作用,在生根诱导过程中,根的伸长、加粗均受到 IAA、ABA 等内源激素的调控。该研究在贵妃玫瑰的生根诱导过程中,发现 IBA 浓度增加至 1.0 mg/L 时,生根数和生根率都很好,但形成大量的愈伤组织且生根分布不均,其原因还需进一步研究。

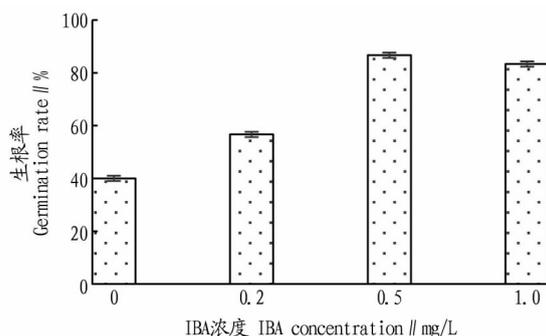


图6 不同 IBA 浓度下贵妃玫瑰的生根率

Fig.6 Rooting rate of Guifeimeigui under different IBA concentrations

### 4 总结

该研究主要对贵妃玫瑰组织培养过程中外植体的选择和继代培养的激素浓度进行了探讨,初步确定了贵妃玫瑰组织培养的技术体系。但是,试验中增殖生根诱导时关于激素配比还需要进一步探究,以为葡萄苗木的标准化生产提供更多的依据。

### 参考文献

- [1] 金万梅,董静,闫爱玲,等.葡萄器官离体再生和遗传转化体系的建立[J].园艺学报,2008,35(1):27-32.
- [2] 杨晓明.葡萄体胚发生、遗传稳定性及其多倍体植株再生研究[D].兰州:兰州大学,2007.
- [3] SIM S T, AL RWAHNIH M, ROWHANI A, et al. Virus elimination from grape selections using tissue culture at Foundation Plant Services, University of California, Davis [C] // Proceedings of the 17th Congress of ICVG. Davis, USA; University of California Davis, 2012:262-263.
- [4] 李国树,邱璐,徐成东,等.葡萄组织培养快速繁殖体系研究[J].北方园艺,2011(9):134-136.

呈上升趋势(图7c),在2000—2008年,尽管出现了18年的最高气温(8.90℃),但总体处于气温低值区间,平均温度为4.03℃;而2009—2017年平均气温为6.49℃,相较于前9年有明显的升高。但气温与湖泊面积的相关系数为0.175,说明气温与湖泊面积几乎没有线性关系,仅呈极弱的正相关关系,说明气温升高使得积雪融化速度加快,积雪融化更多,湖泊得到了更多积雪融水的补给。

### 3 结论

(1)年内2月和3月是流域积雪面积较大的月份;积雪增长从10月开始,一直持续到3月,4月积雪面积仍略高于1月份,这表明3—5月的积雪并没有融化;就季节来看,冬春两季积雪面积最大,春季3月是全年积雪面积最大的月份。

(2)海拔6569m以上为常年积雪区,不受季节影响;海拔6069~6569m积雪日数保持在282d左右,受季节影响较小;海拔6069m以下积雪日数受季节影响很大,5069~6069m每隔500m积雪日数差异明显,分别减小至149、60d;而5069m以下积雪日数相差不大。

(3)佩枯错地处低洼,周围三面环山,尽管降水量补给湖泊更为直接,但流域降水量较少,在融雪期间降水量对湖泊的补给作用并不显著,未通过0.05的显著性检验;而积雪对湖泊的影响显著,积雪融水对湖泊的补给起到了重要的作用,青藏高原逐渐升高的气温对积雪的融化也起到了促进作用。

### 参考文献

- [1] 汪方,丁一汇.不同排放情景下模拟的21世纪东亚积雪面积变化趋势[J].高原气象,2011,30(4):869-877.
- [2] BARNETT T P, ADAM J C, LETTENMAIER D P. Potential impacts of a warming climate on water availability in snow-dominated regions[J]. Nature, 2005, 438: 303-309.
- [5] GRIBAUDO I, RUFFA P, CUOZZO D, et al. Attempts to eliminate phytoplasmas from grapevine clones by tissue culture techniques[J]. Bulletin of insectology, 2007, 60(2): 315-316.
- [6] 王玉安,郝燕,张坤.T形架栽培下贵妃玫瑰葡萄的品质及生长一致性初探[J].甘肃农业科技,2018(10):41-44.
- [7] DAI Z W, MEDDAR M, RENAUD C, et al. Long-term *in vitro* culture of grape berries and its application to assess the effects of sugar supply on anthocyanin accumulation[J]. Journal of experimental botany, 2014, 65(16): 4665-4677.
- [8] 戴彩虹.山葡萄组织培养与离体嫁接亲和性研究[D].兰州:甘肃农业大学,2014.
- [9] 莫银屏,徐丰,石雪晖,等.湘酿1号刺葡萄离体快繁技术试验[J].中外葡萄与葡萄酒,2015(2):26-28.
- [10] 胡文斌,张少飞,孙娜.陇南红提葡萄茎段组织培养研究[J].陕西林业科技,2018,46(1):6-9.
- [11] 陶阿丽,曹殿洁,芳芳,等.植物组织培养技术研究进展[J].长江大学学报(自科版),2018,15(18):31-35.
- [12] SANTNER A, CALDERON-VILLALOBOS L I A, ESTELLE M. Plant hor-

- [3] STEPHUN H. Snow and agriculture[M]//GRAY D, MALE D. Handbook of snow: Principles, processes, management and use. Toronto, Canada: Pergamon Press, 1981: 60-125.
- [4] SCHMUGGE T J, KUSTAS W P, RITCHIE J C, et al. Remote sensing in hydrology[J]. Adv Water Resour, 2002, 25: 1367-1385.
- [5] IMMERZEEL W W, VAN BEEK L P H, BIERKENS M F P. Climate change will affect the Asian water towers[J]. Science, 2010, 328: 1382-1385.
- [6] 王顺久.青藏高原积雪变化及其对中国水资源系统影响研究进展[J].高原气象,2017,36(5):1153-1164.
- [7] 胡豪然.青藏高原东部积雪异常与西南地区春季降水的关系[J].干旱气象,2016,34(3):423-430,493.
- [8] 除多,洛桑曲珍,杨志刚,等.1981—2010年青青藏高原降雪日数时空变化特征[J].应用气象学报,2017,28(3):292-305.
- [9] 拉巴卓玛,次珍,普布次仁,等.2002—2015年西藏雅鲁藏布江流域积雪变化及影响因子分析研究[J].遥感技术与应用,2018,33(3):508-519.
- [10] 蔡迪花,郭妮,王兴,等.基于MODIS的祁连山区积雪时空变化特征[J].冰川冻土,2009,31(6):1028-1036.
- [11] 姜梦筠,刘志红,姜少明,等.2002—2011年新疆积雪时空分布特征研究[J].冰川冻土,2013,35(5):1095-1102.
- [12] 林金堂,冯学智,肖鹏峰,等.基于MODIS数据的玛纳斯河山区雪盖年内变化特征研究[J].遥感信息,2012(2):20-24,80.
- [13] 杨志刚,达娃,除多.近15a青藏高原积雪覆盖时空变化分析[J].遥感技术与应用,2017,32(1):27-36.
- [14] 田柳茜,李卫忠,张尧,等.青藏高原1979—2007年间的积雪变化[J].生态学报,2014,34(20):5974-5983.
- [15] 唐小萍,闫小利,尼玛吉,等.西藏高原近40年积雪日数变化特征分析[J].地理学报,2012,67(7):951-959.
- [16] 秦艳,丁建丽,赵求东,等.2001—2015年天山山区积雪时空变化及其与温度和降水的关系[J].冰川冻土,2018,40(2):249-260.
- [17] 陈敏,高璐,曹永强.2001—2014年阿克苏河流域山区积雪时空变化分析[J].水力发电学报,2016,35(9):28-37.
- [18] 德吉央宗,拉巴卓玛,拉巴,等.1975—2013年西藏佩枯错湖面变化及分析[J].湖泊科学,2016,28(6):1338-1347.
- [19] XU C C, CHEN Y N, LI W H, et al. Potential impact of climate change on snow cover area in the Tarim River basin[J]. Environmental geology, 2007, 53(7): 1465-1474.
- [20] ZHANG G Q, XIE H J, YAO T D, et al. Snow cover dynamics of four lake basins over Tibetan Plateau using time series MODIS data (2001-2010)[J]. Water Resour Res, 2012, 48(10): 1-22.

(上接第53页)

- [5] mones are versatile chemical regulators of plant growth[J]. Nature chemical biology, 2009, 5(5): 301-307.
- [13] MIRANSARI M, SMITH D L. Plant hormones and seed germination[J]. Environmental and experimental botany, 2014, 99: 110-121.
- [14] MCSTEEN P, ZHAO Y D. Plant hormones and signaling: Common themes and new developments[J]. Developmental cell, 2008, 14(4): 467-473.
- [15] BARBA-ESPIN G, DIAZ-VIVANCOS P, CLEMENTE-MORENO M J, et al. Interaction between hydrogen peroxide and plant hormones during germination and the early growth of pea seedlings[J]. Plant, cell & environment, 2010, 33(6): 981-994.
- [16] ZAVATTIERI M A, FREDERICO A M, LIMA M, et al. Induction of somatic embryogenesis as an example of stress-related plant reactions[J]. Electronic journal of biotechnology, 2010, 13(1): 1-9.
- [17] 白瑞兴,温豁然,李学峰,等.葡萄组织培养一次成苗技术[J].北方果树,2009(2):15-16.
- [18] 齐永顺,张志华,王同坤,等.同源四倍体玫瑰香葡萄嫩枝扦插不定根发生过程中内源激素的变化[J].园艺学报,2009,36(4):565-570.
- [19] 马海燕,王美丽,张振文.葡萄新梢生长过程中内源激素含量的动态变化[J].西北农业学报,2007,16(4):177-179,190.