

喀什哈尔葡萄组织培养及再生体系的建立

王起才, 马纪, 张富春

(新疆大学生命科学与技术学院分子生物学重点实验室, 新疆生物资源基因工程重点实验室, 乌鲁木齐 830046)

摘要:以喀什哈尔葡萄单芽茎段为材料,进行了离体组织培养并以实验获得的喀什哈尔葡萄组培苗进行了外植体器官直接再生研究。结果表明:喀什哈尔葡萄单芽茎段最适初始培养基是:MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.01 mg/L,侧芽萌芽率达100%;最适继代培养基是:MS+KT 0.1 mg/L+IBA 0.4 mg/L,同时伸长生长与生根生长,生根率达100%。探讨了喀什哈尔葡萄器官再生的影响因素,并以叶片为试材,建立了植株再生体系。叶片不定芽再生的最佳培养基是MS+6-BA 2.0 mg/L+IBA 0.2 mg/L,再生率为14.3%;最佳生根培养基是MS+KT 0.1 mg/L+IBA 0.4 mg/L,生根效果良好,生根率为92%。

关键词:葡萄;喀什哈尔;组织培养;不定芽;再生

中图分类号:S663.1;S604.7

文献标识码:A

文章编号:1001-4330(2008)01-0042-05

Tissue Culture and Establishment of Regeneration System of Kashihare Grape

WANG Qi - cai, MA Ji, ZHANG Fu - chun

(Key Laboratory of Molecular Biology, College of Life Science and Technology, Xinjiang University, Xinjiang Key Laboratory of Biological Resources and Genetic Engineering, Urumqi 830046, China)

Abstract: In this study, an efficient system of shoot regeneration has been established by use of leaves of Kashihare grape. The results showed that the best auxiliary bud germination medium is MS + 6 - BA 1.0 mg/L + NAA 0.01 mg/L, with the germination rate of 100%. The best subculture medium is MS + KT 0.1 mg/L + IBA 0.4 mg/L. The auxiliary bud germination and the root growth took place at almost the same time in subculture medium, and root rate was up to 100%. The type of the basic medium, the part of explants, the influence of plant growth regulators were investigated in inducing adventitious bud. The results indicated that the highest regenerating rate of adventitious buds were obtained when leaf explants were incubated on MS + 6 - BA 2 mg/L + IBA 0.2 mg/L + Sucrose 25 g/L. The medium MS + KT 0.1 mg/L + IBA 0.4 mg/L + Sucrose 20 g/L was the best for roots inducing, with an average inducing rate of 92%.

Key words: grape; Kashihare; tissue culture; adventitious bud; regeneration

葡萄是最早进行组织培养工作的果树之一。早在1961年Galzy就已成功地进行了葡萄茎尖组织培养工作。随着生物技术的发展,葡萄基因工程研究的需要,近些年来,葡萄的再生体系建立工作取得了较大的进展,国内外许多研究者 Elisabeth Clog 等^[1]、周鹏等^[2]、李云等^[3]、陶建敏等^[4]分别利用葡萄的叶片、叶柄等外植体,通过器官发生途径获得了再生植株;Luci Martinelli 等^[5]、Reustle G. 等^[6]、Zhu Y M 等^[7]、Lunkhe C K. 等^[8]分别利用葡萄的叶片、叶柄等外植体及原生质体,通过体胚发生途径获得了再生植株。但由于葡萄基因型之间的差异,不同研究者之间所用的品种类型获得的再生体系往往有很大差异,这就限制了利用葡萄再生体系从事葡萄遗传转化的进程。

喀什哈尔葡萄(*Vitis Vinifera* L.)有绿、白两种,实验所选材料为绿喀什哈尔。该品种生长势中等,较中熟,果形美观,风味极佳,为新疆优良鲜食品种。但该品种抗逆性较差,抗寒抗旱力弱,果实不耐储运,限制了它的大面积推广。常规育种方式进行葡萄品种改良,往往周期较长,基因工程技术的应用为该品种改良工作提供了新的思路,在进行转基因工作中首要的一步就是要建立再生体系。只有建立高效的再生体系,才有可能促进分子育种的发展,改良现有性状。

收稿日期:2007-05-18

基金项目:国家科技部重大基础研究前期研究专项(2003CCA01000)

作者简介:王起才(1979-),男,河南人,硕士研究生,研究方向为生物技术,(E-mail)charly-2000@sohu.com

通讯作者:马纪(1962-),女,甘肃人,教授,硕士生导师,研究方向为生物技术,(E-mail)majiuci@xju.edu.cn.

1 材料与方 法

1.1 材 料

实验用材料为新疆大学院内种植的绿喀什哈尔葡萄。

1.2 方 法

1.2.1 外植体无菌培养体系的建立

春季清晨从田间(新疆大学家属院内)剪取带腋芽的喀什哈尔葡萄较壮的半木质嫩茎,且叶腋芽不能展开,以刚露出一点头为准,剪取后立即拿入室内。在自来水下反复冲洗,除去病虫枝、残伤枝,将嫩枝剪除幼叶,取前 1~3 节,剪成 3 cm 左右带单芽的茎段。先用洗衣粉水轻轻刷洗表面,流水冲洗 1~2 h。转入超净工作台中用 70% 乙醇浸泡处理 30 s,无菌水冲洗 1 遍后,用 0.1% 升汞表面灭菌 3~8 min,无菌蒸馏水彻底冲洗残留的升汞,将茎段两端各切去 0.5 cm 左右,将余下部分接种(扦插)至初代培养基 MS+6-BA 0~2.0 mg/L+NAA 0~0.01 mg/L+蔗糖 30 g/L+0.7% 琼脂的条件下培养。初代培养 15 d 后腋芽萌发已产生嫩茎,当幼茎伸长至 4 cm 左右在无菌条件下将其剪成有单芽生长点的茎段,接种(扦插)至不同处理的继代培养基中于 16 h 光照(温度 26℃,光强 2 000 lx 以上)/8 h 暗光(温度 22℃),相对湿度 60% 的条件下继代培养获得无菌组培苗。

1.2.2 诱导不定芽基本培养基与外植体的确定

选用 MS、NN₆₉ 基本培养基分别 +6-BA 2.0 mg/L+IBA 0.2 mg/L+蔗糖 25 g/L,pH 5.8;使用以上获得的无菌组培苗叶片、茎段为材料,筛选最佳基本培养基和外植体,40 d 后统计不定芽的发生率。

1.2.3 6-BA 与 IBA 不同浓度的组配筛选

以无菌组培苗的叶片为外植体,以 MS 为基本培养基,附加不同浓度的 6-BA 及 IBA,16 h 光照(温度 26℃,光强 2 000 lx 以上)/8 h 暗光(温度 22℃),相对湿度 60% 培养,接种后定期调查每处理再生的外植体数及每个外植体产生的芽数,40 d 后统计再生频率及每个外植体平均形成的芽数,计算公式为:再生频率=再生外植体数/接种外植体数×100%。

1.2.4 生根培养

将产生的不定芽切割成单个芽体,转接到 MS+KT 0.1 mg/L+IBA 0.4 mg/L+蔗糖 20 g/L(pH 5.8)的培养基上生根培养。

2 结果与分析

2.1 无菌体系的建立

2.1.1 初代培养基的筛选

用 MS 为基本培养基附加不同浓度的 6-BA 和 NAA 对外植体初代培养 10 d 左右,即可发现有侧芽萌发。第 20 d 观察,在 MS 起始培养基上生长的单芽茎段基部产生较多的白色粉状愈伤,且茎段不能出芽死亡。加有 6-BA 1.0 和 2.0 mg/L 的起始培养基,生长情况较好,其中以在 6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.01 mg/L 中生长的芽最为健壮,侧芽萌芽率为 100%。因此认为 MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.01 mg/L 培养基是喀什哈尔葡萄启动分化的最适培养基。表 1

表 1 不同生长激素对比对腋芽萌发的影响

Table 1 Effect of different growth regulators on the germination of axillary bnd

6-BA(mg/L)	NAA(mg/L)	萌芽率(%) Sprouting rate
0	0	5.7(2/35)
0.5	0.01	91.7(33/36)
1.0	0.01	100(45/45)
1.5	0.01	95.2(40/42)

2.1.2 继代培养基的确定

当腋芽萌发出的嫩茎长度为 4 cm 左右,将其切成带有腋芽的小段,观察发现以 MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.01 mg/L 继代培养基发现不能使小茎段正常生长,小茎段生长停滞,20 d 左右枯萎死亡。若以 MS 为基本培养基配以一定浓度的 IBA(0.1~1 mg/L)为继代培养基时均能使幼嫩茎段伸长生长且同

时生根生长。但当 IBA 浓度达到 2 mg/L 以上时则抑制小茎段生根和芽的进一步伸长。小茎段在 MS + KT 0.1 mg/L + IBA 0.4 mg/L 培养基中生长最快,且萌发侧根数量和长度最为理想,苗形态正常,生长健壮,生根率可达 100%,单独使用 MS + 0.4 mg/L IBA 也可使生根率达到 100%,但生长速度慢于前者。继代生长前期幼茎腋芽生长缓慢,在未形成根之前几乎不见腋芽萌发,但在 15 d 左右再生根长达到 0.5 cm 后生长迅速,再 10 d 左右就可长成长 5 cm 的小植株。表 2

表 2 不同生长激素配比的继代培养

Table 2 Effect of different growth regulators on subculture

试验号 Trial number	KT (mg/L)	6-BA (mg/L)	NAA (mg/L)	IBA (mg/L)	增殖率(%) Rate of increase
1	0	1.0	0.01	0	0(0/60)
2	0	0.02	0	0.2	20(6/60)
3	0	0.1	0	0.1	0(0/60)
4	0	0.1	0	0.2	0(0/60)
5	0	0.1	0	0.4	0(0/60)
6	0.1	0	0	0.1	48.1(26/60)
7	0.1	0	0	0.2	67.8(38/60)
8	0.1	0	0	0.4	100(60/60)
9	0	0	0	0.1	33.3(20/60)
10	0	0	0	0.2	53.3(32/60)
11	0	0	0	0.4	100(60/60)
12	0	0	0	1	16.70(10/60)
13	0	0	0	2	6.6(4/60)
14	0	0	0	0.1	33.33(10/30)
15	0	0	0	0.2	53.3(16/30)
16	0	0	0	0.4	100(30/30)
17	0	0	0	1	16.7(5/30)
18	0	0	0	2	6.6(2/30)

2.2 再生体系的建立

2.2.1 叶片和茎段接种后的形态变化及不定芽的形成

将叶片接种于 MS + 6-BA + IBA 的不定芽再生培养基上,培养 10 d 左右,叶片开始明显卷曲、膨大,从叶片及茎段的割伤处开始形成嫩绿色或白色的颗粒状愈伤组织。继续培养至 3 周左右,在叶脉剪伤处开始形成“变形小叶”,其中大多数“变形小叶”不能生长成为不定芽,只有少数部分“变形小叶”可陆续伸长生长为正常的芽。茎段接种后 10 d 左右,茎段的两端变粗膨大,由茎段的割伤处开始形成绿色愈伤组织,继续培养至 3 周左右,在茎段周缘愈伤组织处形成不定芽。图 1

2.2.2 基本培养基与选材部位对再生的影响

MS 基本培养基 + 6-BA 2.0 mg/L + IBA 0.2 mg/L 可以使喀什哈尔葡萄的叶片和茎段直接产生不定芽,其中叶片直接产生不定芽为 14.3%、茎段为 11.8%,叶片再生频率高于茎段;在 NN_{69} 基本培养基 + 6-BA 2.0 mg/L + IBA 0.2 mg/L 中,均未有叶片与茎段产生不定芽,但它们与 MS 基本培养基一样有较高的愈伤组织产生率。由此,可以确定喀什哈尔葡萄直接再生不定芽以 MS 为基本培养基,选材叶片为好。表 3

表 3 基本培养基对喀什哈尔叶片和茎段产生不定芽的影响

Table 3 Effect of different basic medium on the inducing adventitious bud from leaves and stems

培养基类型 Medium type	叶片 Leaf		茎段	
	愈伤组织率 Callus	不定芽再生率(%) Regeneration rate of adventitious bud	愈伤组织率 Callus	不定芽再生率(%) Regeneration rate of adventitious bud
MS	72.9 (97/133)	14.3 (19/133)	68.2(58/85)	11.8 (10/85)
NN_{69}	61(60/99)	0(0/99)	57.2(67/117)	0(0/117)

2.2.3 不同浓度 6-BA、IBA 配比对叶片再生影响

试验以 MS 为基本培养基,设立了 18 个不同的组配对培养基中的 6-BA 和 IBA 浓度进行研究。在 6-BA 1 mg/L 和 IBA 0.1 mg/L 的处理中,叶片产生了不定芽,不定芽产生率为 4.2%;在 6-BA 2 mg/L 与 IBA 0.1,0.2 mg/L 的组合处理也产生了不定芽,其中 6-BA 2 mg/L 与 IBA 0.2 mg/L 处理叶片直接产生的不定芽率最高,达到了 14.3%;在 6-BA 5 mg/L 与 IBA 的各处理中均没有不定芽的产生,愈伤组织的产生率较低,同时愈伤组织的褐化现象也很严重。表 4

表 4 不同浓度的 6-BA 和 IBA 组配对叶片不定芽再生及愈伤组织的影响

Table 4 Effect of 6-BA/IBA on the callus and the adventitious bud regeneration from leaves

试验号 Trial number	6-BA (mg/L)	IBA (mg/L)	愈伤组织(%) Calus from leaf	不定芽再生率(%) Regenerating rate of adventitious bud
1	1	0.01	57.6(72/125)	0(0/125)
2	1	0.05	54.6(59/108)	0(0/108)
3	1	0.1	52.5(62/118)	4.2(5/118)
4	1	0.2	52.4(55/105)	0(0/105)
5	1	0.5	47.4(45/95)	0(0/95)
6	2	0.017	3.1(87/119)	0(0/119)
7	2	0.055	9.1(75/127)	0(0/127)
8	2	0.16	5.3(79/121)	10(12/121)
9	2	0.27	2.9(97/133)	14.3(19/133)
10	2	0.54	7.1(48/102)	0(0/102)
11	5	0.013	5.7(35/98)	0(0/98)
12	5	0.053	1.4(33/105)	0(0/105)
13	5	0.13	4.5(30/87)	0(0/87)
14	5	0.23	0.5(29/95)	0(0/95)
15	5	0.527	1(29/107)	0(0/107)

2.3 生根培养

将叶片、茎段上产生的不定芽,继代培养,在不定芽长到 1~2 cm 时,切割成单芽体转接到 MS + KT 0.1 mg/L + IBA 0.4 mg/L 上,15 d 左右 92% 的不定芽单芽可以正常生根,生根效果良好,30 d 可以长成完整的植株。图 2



图 1 喀什哈尔葡萄叶片再生的不定芽

Fig.1 Adventitious bud from kashihare grape leaves



图 2 不定芽生根

Fig.2 Root regeneration of adventitious bud

3 结论与讨论

3.1 实验首次报道由田间喀什哈尔葡萄获得组培苗,并且使用组培苗叶片及不带芽茎段再生出了小植株。在试验中发现喀什哈尔葡萄单芽茎段初代培养的成活受到材料的幼嫩程度、消毒的影响较大。采用生长中的近副梢的嫩茎段,此处茎段细胞分裂旺盛、生长势旺,容易成活。材料消毒使用 0.1% 升汞 3~8 min 为益,消毒时间过短过长都不利于单芽茎段的再生。升汞消毒时间过长,污染率低,但褐化现象严重;而消毒时间过短,尽管褐化降低,但污染率较高^[9]。在继代培养中,培养基中细胞分裂素 6-BA

的添加不利于喀什哈尔葡萄植株的形成,适当浓度的 IBA 是继代培养成功的关键因素。

3.2 基本培养基的种类是再生的一个影响因素。在喀什哈尔葡萄基本培养基的筛选中,选用 MS 基本培养基附加一定浓度的 6-BA 和 IBA 可以使叶片和茎段产生不定芽,权冬玲等^[10]对红地球葡萄进行再生有相类似结果;在实验中 NN₆₉基本培养基附加 6-BA 和 IBA 不能使叶片和茎段产生不定芽,这一结果与李云、权冬玲使用 NN₆₉基本培养基可以诱导红地球葡萄叶片再生不定芽结果不同,表明在葡萄器官再生途径中最适基本培养基的选择随葡萄栽培品种不同而不同。实验中这两种基本培养基中均可诱导出愈伤组织,其中 MS 培养基诱导产生的量高于 NN₆₉,并且基本培养基其无机盐浓度高于 NN₆₉,说明高浓度无机盐有利于喀什哈尔葡萄愈伤组织的产生。

3.3 植物激素是影响植株再生的另一个关键因素。实验结果表明喀什哈尔葡萄叶片在不同的激素组合条件下,再生能力不同。过高或过低 IBA 的浓度均不能使喀什哈尔葡萄由叶片直接产生不定芽。在中低浓度的 6-BA (1 mg/L)配合中浓度的 IBA(0.1~0.2 mg/L)能够诱导喀什哈尔葡萄叶片直接产生不定芽。

参考文献:

- [1] Elisabeth Clog, Paul Bass, Bernard Walter. Plant organogenesis in Vitis rootstock species[J]. Plant Cell Reports, 1990, (8): 726-728.
- [2] 周鹏, 郭安平, 王跃进, 等. 2 个葡萄品系外植体愈伤组织诱导和植株再生[J]. 热带作物学报, 2002, 9: 53-57.
- [3] 李云, 冯慧, 田砚亭. “红地球”葡萄叶片、叶柄不定芽再生体系的建立[J]. 园艺学报, 2002, 29(1): 60-62.
- [4] 陶建敏, 庄智敏, 章镇, 等. 美人指葡萄不定芽离体诱导再生植株的研究[J]. 果树学报, 2005, 22(5): 551-553.
- [5] Lucia Martinelli, Paolo Bragagna, Valentino Poletti, et al. Somatic embryogenesis from leaf and petiole derived callus of Vitis Scienza[J]. Plant Cell Reports, 1993, 12: 207-210.
- [6] Reustle G, Harst M, Allewdldt G. Plant regeneration of grapevine (Vitis sp.) protoplasts isolated from embryogenic tissue[J]. Plant cell Reports, 1995, 15(3-4): 238-241.
- [7] Zhu Y M, Hoshino Nakano M, et al. Highly efficient system of plant regeneration from protoplasts of grapevine culture and activated charcoal[J]. Plant Science(Shannon), 1997, 123(1-2): 151-157.
- [8] Junkhe C K, Rao P S, Mhatre Mina. Induction of somatic embryogenesis and plantlets[J]. Plant Cell Reports, 1997, 17: 65-67.
- [9] 易丽娟, 曾幼玲, 贺宾, 等. 半无菌表面灭菌获得葡萄单芽茎段无菌材料的方法[J]. 新疆农业科学, 2005, 42(增): 108-110.
- [10] 权冬玲, 常永义. 葡萄不同器官直接再生不定芽研究[J]. 甘肃农业大学学报, 2005, 40(2): 173-177.