

山葡萄“双优”品种组培苗脱毒方法的研究

朱波¹, 曹后男*, 朴日子², 宗成文², 陈蕾²

(1. 南京农业大学, 南京 210095; 2. 延边大学农学院, 吉林 龙井 133400)

摘要: 以山葡萄“双优”品种组培苗为材料, 采用热处理与茎尖培养相结合的方法, 比较不同处理时间、不同茎尖长度对组培苗脱毒茎尖成活率的影响, 同时筛选茎尖脱毒培养的最适合培养基。结果表明: 在葡萄茎尖脱毒培养中, 最适培养基为: MS + 6-BA 2 mg/L + NAA 0.05 mg/L + 蔗糖 30 g/L + 琼脂 9 g/L。采用热处理 20~30 d 的茎尖成活率较单纯茎尖培养(0.2 mm)成活率也有增加, 且热处理时间 20~30 d, 茎尖大小在 0.4 mm 左右时的组培苗长势好, 死亡率几乎为零, 茎尖成活率比较理想。

关键词: 山葡萄; 脱毒; 茎尖培养

中图分类号: S663.1

文献标识码: A

文章编号: 1004-7999(2006)04-0274-05

山葡萄(*Vitis amurens* Rupr.)是葡萄科葡萄属东亚种群的一个种, 山葡萄的天然分布集中在我国东北长白山及小兴安岭山脉、俄罗斯远东地区和朝鲜半岛亦有分布^[1]。山葡萄在葡萄中属最抗寒品种, 根系可忍耐-16℃的低温, 枝蔓可忍耐-40℃以下的低温, 是良好的抗寒砧木材料^[2,3]。同时, 山葡萄是著名的野生浆果, 其特点为酸高糖低、皮厚、汁少、单宁多、色素浓、芳香和无污染, 营养价值极高。每100g鲜品含蛋白质0.2g, 总糖7~9g, 总酸2~3g, 单宁0.05~0.12mg, 钙4mg, 胡萝卜素0.04mg和磷、铁等, 是酿酒和榨汁的极好原料。山葡萄也具有较高的药用价值, 具有补气血、强筋骨、除风湿、利尿等功效, 可治疗气血虚弱、肺虚咳嗽、心悸盗汗、风湿麻痹、淋病、浮肿等症^[4]。但是在多年的生产过程中, 发现它受到多种病毒的侵染。美国 Goheen 教授对我国10个葡萄品种的检测结果表明, 80%的葡萄品种带有卷叶病毒, 70%的葡萄品种带有茎痘病毒, 29%的葡萄品种带有栓皮病毒。葡萄的病毒病(V. Vinifera)遍及全世界葡萄产区, 据田中康宽报导, 世界各地发生葡萄病毒病达30种, 已列出名录的有20种, 对生产危害最大的有扇叶病毒(Grapevine Fanleaf Virus, GFV)卷叶病毒(Grapeleaf Roll Virus, LR)、栓皮病毒(CB)和茎痘病毒(SP)4种^[5], 已严重危害了葡萄的生产, 因而有必要进行脱毒处理, 为生产提供无病毒苗木。本文进行了山葡萄不同脱毒方法的研究, 以期找到最适合的方法。

1 材料与方法

1.1 材料

取山葡萄双优品种的一年生硬枝为外植体, 经组织培养获得的组培苗为供试材料。试材于2003年1月18日从中国农业科学院左家特产研究所引进。

1.2 方法

1.2.1 茎尖培养基的筛选

取双优山葡萄品种的组培苗,在双目解剖镜下切取 1.0 mm 茎尖,接种到如表 1 中的培养基上,培养 40 d 后统计其成活率。

1.2.2 茎尖长度与成活率的关系

取无菌苗在双目解剖镜下切取 0.2, 0.4 mm 茎尖,在筛选出的最适培养基上培养,待萌发长出新叶后调查成活率。

1.2.3 热处理与茎尖培养

在无菌室剪取多次继代培养的组培苗茎尖,插入新鲜的继代培养基(注意培养基的厚度较常规培养的厚,大约 2.5 cm,以防热处理过程中培养基干枯)。待长出根系及新叶时,放入 LRH-250-G 型光照培养箱中培养 20, 30, 40 d。光培条件为:38~40 ℃ 和 22 ℃ 变温处理;光照时间为 7:00~15:00,暗培养时间 15:00~7:00,光强 2 500 Lx。在各处理时间结束后统计苗木死亡率,然后剥取 0.4 mm 茎尖培养,接种 40 d 左右统计成活率。培养基琼脂含量为 5~8 g/L, pH 值调至 5.8~6.0。培养条件:培养温度为(25±2) ℃,光照强度为 2 000~2 500 Lx 左右,光照时间为 14 h/d。用 SPSS11.5 统计分析软件对数据进行方差分析。

2 结果与分析

2.1 茎尖培养基的筛选

双优品种的茎尖在 3 种分化培养基上进行培养,在添加 6-BA 2 mg/L 和 NAA 0.05 mg/L 的 MS 培养基上的茎尖大约 10 d 最先开始萌动,40 d 左右 3 种培养基上的茎尖都萌发长出新叶。培养 40 d 左右统计其成活率(表 1)。

表 1 不同培养基对“双优”品种微茎尖成活率的影响

Table 1 Effect of different media on the microapical survival rate of "Shuang You"

编号 No.	培养基/(mg/L) Medium	接种茎尖数 No. of inoculation shoot tips	成活茎尖数 No. of survival shoot tips	成活率/% Survival rate
1	MS+6-BA2+NAA 0.05+蔗糖 30 g/L	18	15	83.33 a
2	1/2MS+6-BA 0.05+蔗糖 20 g/L	27	19	70.37 a
3	B5+IAA 0.2+NAA 0.1+蔗糖 20 g/L	25	16	64.00 a

由表 1 可知,双优品种的茎尖在添加 6-BA 2 mg/L 和 NAA 0.05 mg/L 的 MS 培养基上的成活率最高,为 83.33%,其次是含有 6-BA 0.05 mg/L 的 1/2MS 培养基,而在含有 IAA 0.2 mg/L 和 NAA 0.1 mg/L 的 B5 培养基上最低,但在 3 种培养基上的成活率差异不显著。由图 1 可知,一号培养基上的茎尖诱导产生的愈伤组织为紧密的绿色,而且分化丛数多、生长快,而其余 2 种培养基上的则是直接在原来的茎尖上萌发,但分化的芽少且颜色发黄。综上所述,MS+6-BA 2 mg/L+NAA 0.05 mg/L+蔗糖 30 g/L 培养基为“双优”品种茎尖脱毒的最适宜分化培养基。

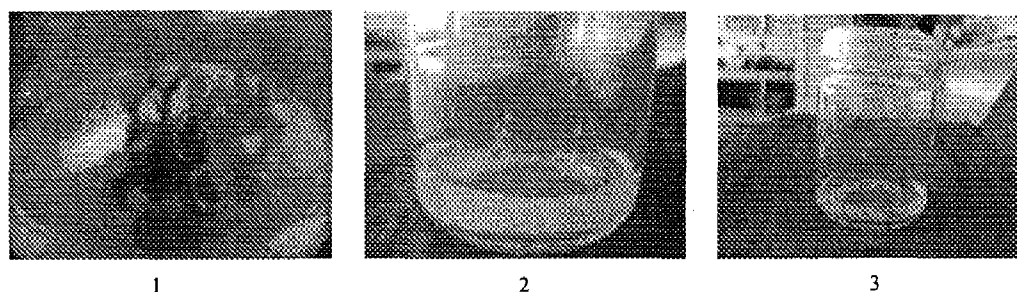


图 1 “双优”品种在 3 种培养基上的生长情况

Fig.1 Growth of “Shuang You” on three media

2.2 茎尖长度与培养成活率的关系

葡萄茎尖长度与成活率呈正相关,与脱毒率呈负相关.接种 10 d 观察不同茎尖长度的生长情况,0.2 mm 的茎尖干枯现象很普遍,有些虽未干枯,但不萌芽;而长度为 0.4 mm 的茎尖已经萌发.接种 40 d 左右统计成活率(表 2).

由表 2 可知,不同茎尖长度的成活率之间存在显著差异,当切取茎尖长度为 0.2 mm 时,小株成活率为 23.68%;切取茎尖在 0.4 mm 时,成活率为 74.42%,随着茎尖长度的减小成活率降低.

表 2 茎尖长度对“双优”品种微茎尖成活率的影响

Table 2 Effects of tip length on microapical survival rate of “Shuang You”

茎尖长度/mm	剥离茎尖数	成活茎尖数	成活率/%
Shoot tip length	No. of inoculative shoot tips	No. of survival shoot tips	Survival rate
0.2	38	9	23.68 b
0.4	43	32	74.42 a

2.3 不同热处理时间对组培苗死亡率和茎尖成活率的影响

“双优”品种组培苗不同热处理时间的结果(表 3).表明,在热处理 20 d 和 30 d 后茎尖死亡率均为 0,组培苗长势旺盛,取其茎尖培养容易成活;热处理 40 d 后,“双优”品种出现死亡现象,说明随着热处理时间的延长,组培苗的死亡率升高.

表 3 不同热处理时间对“双优”品种组培苗死亡率和茎尖成活率的影响

Table 3 Effects of different heat treatment time on tube seedlings death rate and microapical survival rate of “Shuang You”

处理时间/d	处理苗数	死亡率/%	接种茎尖数	成活茎尖数	成活率/%
Treatment time	No. of seedlings	Death rate	No. of inoculated shoot tips	No. of survival shoot tips	Survival rate
20	24	0	25	22	88.00 a
30	24	0	34	29	85.29 a
40	24	37.50	20	13	65.00 b

在热处理 20, 30 d 后茎尖成活率均较高,2 个处理间的差异不显著,分别为 88% 和 85.29%;与热处理 40 d 组培苗的茎尖成活率差异显著.同时采用热处理 20~30 d 的茎尖成活

率较单纯茎尖培养(0.2 mm)成活率也有增加.图 2 为山葡萄品种脱毒过程中的生长情况.

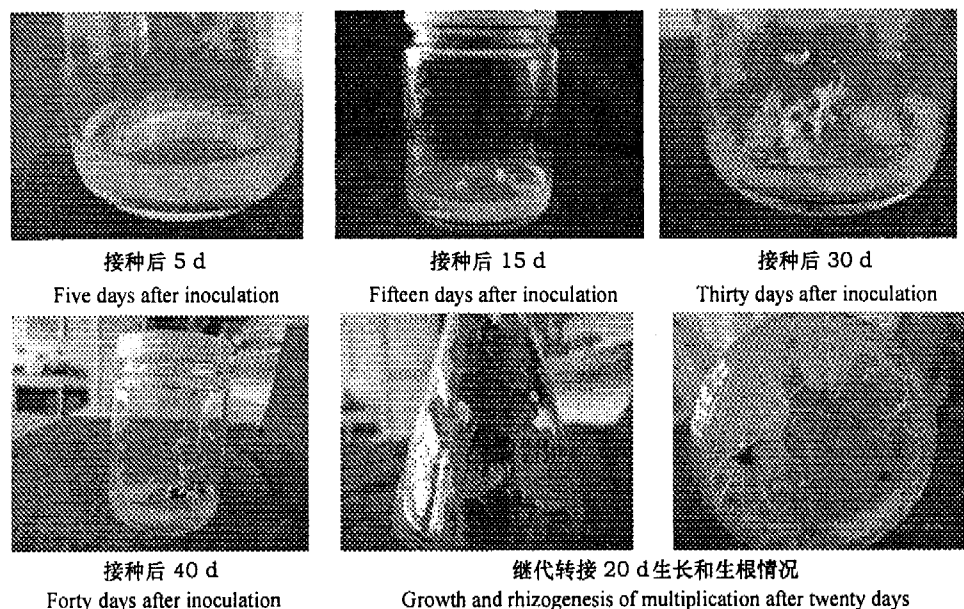


图 2 “双优”品种在脱毒过程中的生长情况

Fig.2 Growth of "Shuang You" during the virus-free course

3 讨论与结论

据有关资料报道,单纯用茎尖培养或热处理方法进行脱毒效果均不理想.本研究把 2 种方法相结合运用于葡萄苗的培养,以充分发挥各自的脱毒效果.热处理脱毒的机理主要是使病毒发生钝化作用,延缓其在植株体内的扩散速度,而微茎尖脱毒则是根据病毒在植株体内分布不均匀,生长点几乎不含病毒的特点,利用茎尖培养获得脱毒苗.近年来的研究证明,用热处理和茎尖培养相结合的方法培育无病毒母本苗效果较好,特别是对于一些难于用茎尖培养或热处理脱毒的果树病毒,此种方法尤为重要.采用这种方法,即使用大的外植体,也能增加无病毒株数^[6].

葡萄茎尖脱毒培养的最适培养基为:MS + 6-BA 2 mg/L + NAA 0.05 mg/L + 蔗糖 30 g/L + 琼脂 9 g/L.采用热处理 20~30 d 的茎尖成活率较单纯茎尖培养(0.2 mm)成活率也有增加,且热处理时间为 20~30 d,茎尖大小在 0.4 mm 左右时的组培苗长势好,死亡率几乎为零,茎尖成活率较理想.

参考文献:

- [1] 葛玉香,沈育杰.山葡萄种质资源评价与利用研究现状[J].中外葡萄与葡萄酒,2000(4):16-20.
- [2] 宋润刚,路文鹏.山葡萄品种特性、评价及配套栽培技术[J].中外葡萄与葡萄酒,2000(3):22-25.
- [3] 宋润刚,路文鹏.山葡萄品种选育回顾与展望[J].北方园艺,1996(6):36-38.
- [4] 张金柱,戴永平,王万民.山葡萄资源开发及利用[J].中国林副特产,2002(2):58.
- [5] 宋润刚,李昌禹.山葡萄及其杂交品种组培脱毒技术的研究[J].葡萄栽培与酿酒,1996(2):22-24.
- [6] 张玉清,罗晓芳,田砚亭.葡萄微茎尖培养和葡萄扇叶病毒的 ELISA 和探针检测[J].北京林业大学学报,1998,20(4):54-58.

Virus-eliminated methods for the seedlings of "Shuang You" in *Vitis amurensis* Rupr

ZHU Bo¹, CAO Hou-nan^{*}, PIAO Ri-zi², ZONG Cheng-wen², CHEN Lei²

(1. Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China;

2. Agricultural College of Yanbian University, Longjing Jilin 133400, China;)

Abstract: The tube seedlings of "Shuang You" in *Vitis amurensis* Rupr were selected as the method of heat treatment combined with tip culture to study the effects of different heat treatments and different tip lengths on the survival rate of shoot tips and the suitable medium for virus-eliminated tip culture was obtained. The results showed that the suitable medium for microapical culture was MS + 6-BA 2 mg/L + NAA 0.05 mg/L + sucrose 30 g/L + agar 9 g/L. The tip survival rate under heat treatment for 20~30 days was higher than single tip culture (0.2 mm). Moreover, when tip length was 0.4 mm and the time for heat treatment was 20~30 days, tube seedlings grew well, and the death rate was almost zero and tip survival rate was good.

Key words: *Vitis amurensis* Rupr.; virus-eliminated; tip culture

[上接第 262 页]

Mensuration methods for single leaf area of apple-pear

WU Yu-de, LIU Ji-sheng

(Agricultural College of Yanbian University, Longjing Jilin 133400, China)

Abstract: The simple linearity regression equation and multiple regression equation of single leaf area of apple-pear were inoculated by measuring and analysing their leave areas. The results showed that the two equations reached significant level and the correlation coefficient was 0.99. The regression equation of leaf-long × leaf-broad to area of leaf: $\hat{Y} = -1.1945 + 0.6432x$ was the best one, which could applied largely in productive practice and study.

Key words: apple-pear; leaf area; leaf-length; leaf-breadth