

# 木纳格葡萄组织培养快繁技术的研究简报

曾斌<sup>1</sup>, 罗淑萍<sup>2</sup>, 任盈盈<sup>1</sup>, 李疆<sup>1</sup>, 顾建新<sup>3</sup>

(1. 新疆农业大学园艺学院, 乌鲁木齐 830052; 2. 新疆农业大学农学院, 乌鲁木齐 830052;

3. 乌鲁木齐县果蔬研究所, 乌鲁木齐 830056)

**摘要:** 研究以新疆特色葡萄品种木纳格幼嫩茎段为繁殖材料, 相继进行增殖培养和生根培养, 从而获得优质组织培养苗木。试验表明: 最佳增殖培养基为:  $B_5 + BA 0.5 \text{ mg/L} + IBA 0.05 \text{ mg/L} + NAA 0.05 \text{ mg/L}$ ; 最佳生根培养基为:  $1/2MS + IBA 0.5 \text{ mg/L} + NAA 0.5 \text{ mg/L}$ 。研究为木纳格葡萄的快速繁殖生产及生物技术育种工作提供了一定的依据。

**关键词:** 木纳格葡萄; 外植体; 快速繁殖

中图分类号: S663.104.8

文献标识码: A

文章编号: 1001-4330(2007)03-0340-04

## Brief Report of Tissue Culture and Fast Regeneration of Munake Grape in Xinjiang

ZENG Bin<sup>1</sup>, LUO Shu-pin<sup>2</sup>, REN Ying-ying<sup>1</sup>, LI Jiang<sup>1</sup>, GU Jian-xin<sup>3</sup>

(1. Horticultural College of Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052, China; 2. College of Agronomy, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052, China; 3. Institute of Fruit and Vegetable Urumqi County, Urumqi 830056, China)

**Abstract:** This paper used Munake Grape as regeneration materials and its young stems as explants. The explants were inoculated on culture medium which were induced to take root. Then, the multiplication culture and rootage culture were made in order to get tissue culture seedling. **The experiment indicated: the best bud multiplication culture medium is:  $B_5 + BA 0.5 \text{ mg/L} + IBA 0.05 \text{ mg/L} + NAA 0.05 \text{ mg/L}$ ; the best culture medium of rooting is:  $1/2MS + IBA 0.5 \text{ mg/L} + NAA 0.5 \text{ mg/L}$ .** This experiment provided some basis for the study on Munake Grape propagation and production and breeding.

**Key words:** Munake Grape; explants; rapidly propagate

木纳格葡萄, 别名克孜木纳格, 欧亚种, 起源于我国新疆喀什地区。木纳格葡萄植株适合生长在新疆及西北干旱、积温较高的地区, 在新疆喀什地区、和田地区和克孜勒苏自治州阿图什市栽培较多<sup>[1]</sup>。木纳格为穗大粒大, 色泽艳丽, 耐贮运的优良晚熟鲜食品种, 该品种为典型的东方品种群品种, 曾在第二届中国农业博览会上获金奖。随着自治区经济的发展和人民生活水平的提高, 未来的葡萄产业将有更加广阔的发展前景<sup>[2]</sup>。

近年来, 随着现代生物技术的迅猛发展, 各种遗传转化方法和遗传转化体系的建立, 通过基因工程, 一批与葡萄抗逆性有关的基因已陆续被克隆出来。新疆已成为我国最大的葡萄生产省区, 因此, 以新疆特色优质鲜食葡萄品种木纳格为材料, 利用现代生物育种技术开展葡萄的转基因抗性育种和品种改良研究, 扩大其生产, 对促进新疆特色林果资源的开发利用和产业可持续发展具有重要意义, 但是其必需建立在成熟的葡萄组织培养技术平台基础之上。研究木纳格葡萄的离体芽的诱导、继代增殖培养及生根培养, 以期今后更好的开展木纳格葡萄的快速繁殖和生物技术育种工作打下基础<sup>[3,4,5]</sup>。

收稿日期: 2006-10-24

基金项目: 新疆维吾尔自治区重点实验室开发项目“葡萄组培体系的建立与转基因的应用”(新疆生物资源基因工程重点实验室)(XJDX0201-2005-13)

作者简介: 曾斌(1970-), 男, 湖北人, 讲师, 硕士, 研究方向为果树栽培及园艺作物组织培养, (E-mail) zbxnd@163.com

通讯作者: 李疆(1959-), 男, 湖南人, 教授, 博士, 博导, 研究方向为森林培育、果树栽培、生理、育种、园艺生物技术, (E-mail) lijiangxj@

## 1 材料与方法

### 1.1 材料及处理

实验采用乌鲁木齐县果蔬研究所引进栽培的木纳格葡萄健壮植株上的茎段为试材进行繁殖。

将采取的嫩梢,除去叶片,剪成具 2~3 个节位的枝条,放在清洁的玻璃瓶中。先用洗洁精或洗衣粉洗去表面尘土,再置于自来水下冲洗 12~20 min。清洗过的茎段移至超净工作台,在 70% 的酒精液内消毒 30 s,再用 0.1% 的升汞<sup>[5]</sup>浸泡 3~4 min,表面消毒时要不断振荡,使材料与消毒溶液充分接触。消毒后用无菌水冲洗 2~3 次,将幼嫩茎段截取 1~1.5 cm 长,接种至组培瓶中,每瓶接 3 个,重复 10 瓶。后放置培养室里培养。1 个月后,进行增殖培养。

茎段培养所用的诱导培养基是以 B<sub>5</sub> 为基本培养基<sup>[4]</sup>,添加 BA(0.2 mg/L),附加白沙糖 30.0 g/L,琼脂 6.0 g/L,pH 在培养基灭菌消毒前调至 5.8<sup>[3,4,6]</sup>

### 1.2 培养条件

培养室温度 20~28℃,光照强度 3 000~5 000 lx。光照时间 12 h/d。

### 1.3 增殖培养

从诱导产生的无菌嫩茎中取 1.5 cm 左右的嫩茎接种于不同处理组合的增殖培养基上,以 B<sub>5</sub> 为基本培养基,BA(0.5、1.0 和 1.5 mg/L)、IBA(0、0.05 和 0.1 mg/L)和 NAA(0、0.05 和 0.1 mg/L),实验采用正交试验设计方案 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>)。30 d 后统计增殖倍数。实验重复 3 次,接入过程中要求无菌、快速、防止污染及防伤口失水影响试验结果。最后,放置在培养室中培养,并定期观察,统计出嫩茎的增殖倍数。实验设计及结果采用正交试验设计检验法统计分析。

### 1.4 壮苗培养

取继代培养 3 代以上 1~1.5 cm 的茎段为材料培养壮苗。

确定适合培养壮苗的 BA 浓度,仍采用 B<sub>5</sub> 培养基为基本培养基,试验 BA 0.1 和 0.2 mg/L 两种培养基对木纳格葡萄品种的壮苗效果,每瓶接种 3 个嫩茎,重复 10 瓶。20 d 左右,以壮苗的株高、生长状况为指标观察,确定适合培养壮苗 BA 浓度。

通过确定壮苗培养适合的 BA 浓度,选出最适的培养方法培养壮苗,在培养期间,采用大型三角瓶有利于试管嫩梢的延长,繁殖效率高<sup>[7~9]</sup>。

### 1.5 根系诱导

为了选择促进小苗生根快,根系发育好的生长素,试验以 1/2MS 为基本培养基,附加不同浓度的 IBA(0、0.1、0.5、1.0 和 1.5 mg/L)和 NAA(0、0.1、0.5、1.0 和 1.5 mg/L)。最终选择适宜的生根培养基,以培养出优质的试管苗<sup>[10,11]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 增殖培养

分别安排因素 A、B、C,确定了 9 个实验方案。其中 T<sub>1</sub>、T<sub>2</sub>、T<sub>3</sub> 为各列对应 1、2、3 水平增殖率之和。X<sub>1</sub> = T<sub>1</sub>/3、X<sub>2</sub> = T<sub>2</sub>/3、X<sub>3</sub> = T<sub>3</sub>/3 依次表示各列对应 1、2、3 水平的平均增殖率;对试验结果分析选取最好的水平搭配。先从极差最大的因素 C 入手,选取平均增殖最高水平 C<sub>2</sub>再从极差次之的因素 A 中选取平均增殖最高水平 A<sub>2</sub>,最后选取 B<sub>2</sub>,三者的搭配 A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>C<sub>2</sub>,即 BA 1.0 mg/L + IBA 0.05 mg/L + NAA 0.05 mg/L。即是最佳的实验方案。

研究表明,第 4 号实验方案 A<sub>2</sub>B<sub>1</sub>C<sub>2</sub> 增殖率最高,为了进一步摸清三因素增殖率的影响,需要再对这两个方案进行试验,其结果是 A<sub>2</sub>B<sub>1</sub>C<sub>2</sub> 的增殖率为 3.56;而 A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>C<sub>2</sub> 的增殖率为 4.55,结合试验和理论分析,得出木纳格葡萄增殖培养的最佳培养基配方为:B<sub>5</sub> + BA 1.0 mg/L + IBA 0.05 mg/L + NAA 0.05 mg/L。表 1

### 2.2 培养壮苗的 BA 浓度

在一些植物的微繁殖中,伸长培养是同增殖及生根培养阶段结合在一起的,也可以将伸长培养作为单独一个培养阶段,这是因为增殖培养后形成的微型枝芽在培养后期的阶段中单个嫩茎很不便于操作,而且据经验,不够健壮的枝芽在生根培养中反应也极差,如生根率低或单株生根的根数少等问题,从而直接影响到以后移栽成活率。实验发现在 B<sub>5</sub> + BA 0.1 mg/L 培养基中,木纳格葡萄组培苗平均株高整

齐,叶片较大,叶色浓绿,茎节粗壮,植株生长势强,表现出很好的壮苗效果。

表 1 木纳格葡萄增殖培养正交试验设计方案  $L_9(3^4)$  及统计分析

Table 1 Analysis on design proposal  $L_9(3^4)$  of orthogonal experiment of proliferation culture of Munade Grape and its statistical results

试验号 No of experiment	A(BA) (mg/L)	(B)IBA (mg/L)	(C)NAA (mg/L)	隔接种总数(个) No of inoculated stems	增殖倍数(倍) Proliferated multiple
1	1 (0.5)	1 (0)	1(0)	22	2.36
2	1 (0.5)	2 (0.05)	2(0.05)	21	2.91
3	1 (0.5)	3 (0.1)	3(0.1)	20	2.57
4	2 (1.0)	1 (0)	2(0.05)	19	3.56
5	2 (1.0)	2 (0.05)	3(0.1)	22	2.91
6	2 (1.0)	3 (0.1)	1(0)	19	2.50
7	3 (1.5)	1 (0)	3(0.1)	20	2.43
8	3 (1.5)	2 (0.05)	1(0)	21	2.88
9	3 (1.5)	3 (0.1)	2(0.05)	22	2.63
$T_1$	7.84	8.36	7.74		
$X_1$	2.61	2.78	2.58		
$T_2$	8.97	8.70	9.10		
$X_2$	2.99*	2.90*	3.03*		
$T_3$	7.94	7.70	7.91		
$X_3$	2.65	2.57	2.64		
极差 R Range	0.38	0.33	0.4		
最优水平 Optimal	$A_2$	$B_2$	$C_2$		

### 2.3 根系诱导

在没有生长素的对照组中,接种 30 d 后,试管苗没有生根,而在培养基中附加 IBA 和 NAA 对木纳格葡萄试管苗生根有明显促进作用,但 IBA 效果明显高于 NAA,在 IBA 处理组中,当 IBA 浓度为 1.0 mg/L 时,接种 25 d 之后,生根率可达 90% 以上,但苗基部膨大,组织疏松,根系虽然发达,但根脆易断,移栽成活率不高;NAA 和 IBA 配合使用,在 IBA 为 0.5 mg/L + NAA 0.5 mg/L 时,30 d 时生根率也可达 90%,而且根系发育较好,在温湿度适宜的条件下,移栽成活率及生长比较理想。表 2

表 2 木纳格葡萄试管苗生根诱导试验情况

Table 2 Experiment of rooting inducement of test-tube seedling of Munake Grape

生长素(mg/L) Homone		生根率(%) Rooting rate				
IBA	NAA	7 d	15 d	20 d	25 d	30 d
0	0	0	0	0	0	0
0.1	0	0	0	0	0	0
0.5	0	9.6	18.5	29.8	33.6	53.6
1.0	0	19.2	48.5	61.9	90.5	91.6
1.5	0	15.6	26.9	38.6	61.5	67.6
0	0.1	0	0	0	0	0
0	0.5	0	0	12.6	25.6	39.5
0	1.0	0	9.5	16.9	31.5	41.2
0	1.5	16.0	28.6	43.5	67.6	72.3
0.5	0.5	18.6	40.5	67.6	87.5	90.0
1.0	1.0	10.5	26.5	55.6	69.6	75.6
1.5	1.5	16.2	26.8	39.6	61.8	70.3

### 2.4 试管苗的驯化和移栽

将已生根的瓶苗移出培养室,放置散射光较强处炼苗,使瓶苗在出瓶前充分进行光、湿、温的锻炼。移出 3 d 后拧松瓶盖,5 d 后将瓶盖揭开,7 d 后小心倒出瓶苗,用自来水冲洗,洗净培养基,并直接移植到塑料小拱棚或温室内的苗床上。相对湿度大于 80% 的条件下,经过 10 d,移栽苗的叶大而绿,生长势强,据最后统计,组培木纳格葡萄苗成活可达 90%。需要注意的是瓶苗出瓶前,先拧松几天后方可揭

开,不能一下揭开,否则瓶苗容易萎焉。另外,据观察出瓶移植成活率与生长季节有关,3~4月、8~9月成活率较高,5~7月及10月之后成活率开始下降<sup>[4,8,9,11,12]</sup>。

### 3 结论

3.1 研究采用微繁殖技术,以茎段芽器官离体培养繁殖,以芽繁芽,芽器官未经愈伤组织阶段,有利于各优良无性系遗传性状的稳定。

3.2 葡萄组织培养玻璃化现象是一个影响正常生长的关键问题,不但导致扩繁速度慢、效率低、成本高,同时对下一步的移栽成活造成较大影响,实验中发现 BA 浓度过高,在超过 1.0 mg/L 时,玻璃化现象较严重。实验中应注意控制激素浓度。另外环境因素也与玻璃化有关。使用 27~30℃ 的适当高温及使用一定透气性培养容器有利于降低玻璃化现象,而用橡皮塞及棉花塞的三角瓶培养的苗玻璃化现象较严重。

3.3 在组织培养增殖培养之后,在加有较高浓度的 BA 及一定量的 IBA、NAA 的增殖阶段后紧接着进行一个低浓度的 BA 壮苗阶段可以改变植物体内内源激素水平的平衡,从而有利于后面的生根培养。实验中,从茎高、茎粗、叶数、叶间距等形态特征出发来综合评价壮苗效果。

#### 参考文献:

- [1] 李良瀚. 鲜食葡萄优良品种及无公害栽培技术[M]. 北京: 中国农业出版社, 2004: 76-77.
- [2] 晁无疾. 葡萄优良新品种及栽培原色图谱[M]. 北京: 中国农业出版社, 2003.
- [3] 程宗明, 徐喜楼, 盛炳成, 等. 葡萄组织培养的现状与展望[J]. 果树科学, 1992, (1): 50-55.
- [4] 曹孜义. 葡萄组织培养技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 1993.
- [5] 陈振光. 园艺植物离体培养学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2003, (10): 7.
- [6] 朱广廉. 植物组织培养中的外植体灭菌[J]. 植物生理学通讯, 1996, (6): 444-449.
- [7] Chu Chih - Ching. Contributions of Chinese Botanists to Plant Tissue Culture in the 20th Century[J]. Journal of Plant Science, 2002, (9): 1 075 - 1 084.
- [8] 张祖玉. 野生葡萄离体培养研究[J]. 中外葡萄与葡萄酒, 2000, (2): 22-24.
- [9] 于惠敏, 路朋, 何晓光. 植物组织培养技术及常见问题和解决措施[J]. 山东教育学院学报, 2005, (6): 101-103.
- [10] Li Yong - li, LAN Da - wei, BI Jing - hua, et al. Organ formation and plant regeneration in vitro of *Actinidia polygama*[J]. Journal of Fruit Science, 2005, (3): 220-223.
- [11] 庄飞云, 吴震, 李式军. 无机组培快繁葡萄苗技术(简报)[J]. 北方园艺, 2001, (4): 298-299.
- [12] 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, (1): 90-93.