

毛葡萄组织培养的脱毒技术

石贵玉, 陈耕云, 廖文雪

(广西师范大学 生命科学院, 广西 桂林 541004)

摘 要:以“九龙二号”毛葡萄幼芽为外植体, 诱导无根试管苗, 研究其脱病毒和植株再生技术。结果表明, 采用白天 37 °C 处理 8 h (光照强度 $40 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$), 晚上 22 °C 处理 16 h 的变温方法处理 10~15 d, 取 0.8~1.0 mm 茎尖接种于 $B_5 + BA 0.5 \text{ mg/L} + IAA 0.1 \text{ mg/L}$ 培养基中, 茎尖存活率可达 80% 以上, 且脱毒效果达 100%。1/2 MS+BA 0.2 mg/L + IAA 0.6 mg/L 诱导根的效果最佳, 生根率达 86.7%。

关键词:毛葡萄; 脱病毒; 植株再生

中图分类号: Q813.1

文献标识码: A

文章编号: 1001-6600(2008)03-0071-04

毛葡萄是广西罗城、都安、大化等县种植面积最大的山葡萄品种, 具有适应性强、耐旱的特性, 是防止石漠化、恢复生态环境植物之一^[1]; 同时, 由于毛葡萄浆果是极好的酿酒原料, 其产物毛葡萄酒在医疗保健上具有良好的作用^[2], 所以种植毛葡萄也是发展石山地区经济的主要途径之一。随着毛葡萄酒消费量的增加和酿酒工业的发展, 毛葡萄酒原料短缺的问题越来越突出, 建立毛葡萄原料生产基地, 使毛葡萄从野生生产转为产业化生产是急需解决的问题。在国内, 利用生物技术对葡萄进行组织培养和脱毒处理, 成功培育优良品种已有报道。邹喻等^[3,4]和王以红等^[5]利用优良单株毛葡萄的茎段进行组织培养, 成功繁殖出完整小植株, 并在生产上推广应用, 推动了毛葡萄的生产。但利用生物技术结合脱病毒法对罗城特有的野生毛葡萄茎尖进行脱病毒, 从而培育脱毒苗以及快速繁殖毛葡萄脱毒苗的研究国内尚无报道。本文旨在探索毛葡萄脱毒苗的技术途径和植株再生的较佳条件, 以便为毛葡萄建立快繁体系和无病毒种苗的工厂化生产提供理论依据和实验基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

毛葡萄 *Vitis quinquangularis* Rehd 品种九龙二号(广西罗城水果局提供)。

1.2 实验方法

2 月份时, 将长约 20~40 cm 毛葡萄茎段扦插于实验室沙盆中, 保持沙土湿润, 待长出嫩芽, 取 3~5 cm 毛葡萄嫩芽作为外植体进行组织培养, 诱导无根试管苗, 再取无根试管苗进行脱毒试验。

将获得的无根试管苗接种在 $B_5 + BA 0.5 \text{ mg/L} + IAA 0.1 \text{ mg/L}$ 培养基中, 置于光照培养箱内(白天 37 °C 处理 8 h、光照强度 $40 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, 晚上 22 °C 处理 16 h)分别进行变温热处理 7、10、15、25 d。在无菌工作台上将不同天数热处理的无根试管苗置于解剖镜下, 剥取 0.3~1.5 mm 长的茎尖接种于 $B_5 + BA 0.5 \text{ mg/L} + IAA 0.1 \text{ mg/L}$ 培养基中, 在 25 °C、光照强度 $30 \sim 40 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 培养室内每天 12 h 光照培养, 诱导芽的形成。

当芽生长成 2~3 cm 苗时进行增殖, 增殖培养基为: $B_5 + BA 0.5 \text{ mg/L} + IAA 0.1 \text{ mg/L}$ 。

生根培养基为: 1/2 MS+BA 0.2 mg/L+不同浓度生长素+0.1%活性炭。

由广西农业科学院重点实验室用分子生物学检验法(RT-PCR)检验毛葡萄试管苗脱毒效果。

收稿日期: 2008-04-10

基金项目: 国家自然科学基金项目资助(30660036)

通讯联系人: 石贵玉(1953—), 男, 广西百色人, 广西师范大学教授。E-mail: glshigy@163.com

2 结果与分析

2.1 不同热处理时间对毛葡萄试管苗的影响

热处理脱毒法是根据病毒和寄主细胞对高温忍耐程度的差异,采用适当的温度和处理时间,使寄主体内病毒浓度降低或失活,从而达到脱毒的目的^[6]。本实验采用白天 37℃ 处理 8 h(光照强度 40 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$),晚上 22℃ 处理 16 h 的变温方法处理 7、10、15、25 d,结果见表 1。随着热处理时间的延长,无根苗的生长表现迟缓,直至大部分死亡。可见材料存活率和热处理时间密切相关,处理时间愈长无根苗的存活率就愈低,这与张玉满等人在葡萄品种“天康”和“坂田良智”上所得的实验结果相似^[7]。因此,为了保证热处理后毛葡萄无根苗有较高的成活率,同时保证达到一定的脱毒效果,毛葡萄热处理的时间最好选择在 10~15 d。

表 1 热处理时间对处理材料的影响

Tab. 1 Effects of different time of heat treatment on material

热处理时间/d	处理瓶数/瓶	存活瓶数/瓶	存活率/%	生长情况
7	10	10	100.0	生长缓慢,未见增殖
10	10	9	90.0	生长缓慢,叶色变淡白
15	10	8	80.0	少量苗死亡,出现玻璃苗
25	10	2	20.0	多数苗褐变死亡,叶片白

2.2 茎尖长度对培养茎尖存活率的影响

茎尖培养脱毒的依据是病毒在感染植株上的分布不一样,幼嫩的组织含量较低,生长点含病毒很少或无病毒侵染^[6],利用植物组织培养技术,切取茎尖进行培养而达到脱除病毒的目的。实验取热处理 12 d 的无根试管苗在超净工作台上剥取一定大小的茎尖接种到 $B_5 + BA 0.5 \text{ mg/L} + IAA 0.1 \text{ mg/L}$ 培养基中培

表 2 茎尖长度对存活率的影响

Tab. 2 Effects of size of meristem tip on rate of survival

茎尖长度/mm	茎尖数/个	成活茎尖数/个	存活率/%
0.3~0.5	17	7	41.2
0.8~1.0	17	15	88.2
1.0~1.2	16	16	100.0

养,10 d 后统计其存活率,结果见表 2。结果表明,茎尖存活率和茎尖取材长度成正比,但朱世民等认为脱毒效果和茎尖长度呈反比^[6]。结合本试验的脱毒效果(本文 2.4 内容)综合考虑,取 0.8~1.0 mm 的茎尖较好,既能保持较高的存活率,又得到较理想的脱毒效果。

2.3 不同培养基对毛葡萄无根苗生根的影响

当芽丛继代培养长至 2 cm 左右时,将无根苗转入不同生根培养基中诱导生根,实验结果(表 3)表明,毛葡萄无根苗的生根诱导并不困难,在 3 种培养基中培养均能生根,但诱导生根的效果有差异,2 号培养基中芽生根率高且根多、基部愈伤组织少,是较为理想的生根培养基。

表 3 不同培养基对生根的影响

Tab. 3 Effects of different medium on rooting

编号	培养基种类	接种数/株	生根数/株	生根率/%	生根情况
1	1/2 MS+BA 0.2 mg/L+IAA 0.1 mg/L	15	12	80.0	根粗壮但基部愈伤组织多
2	1/2 MS+BA 0.2 mg/L+IAA 0.6 mg/L	15	13	86.7	根多愈伤组织少
3	1/2 MS+BA 0.2 mg/L+NAA 0.1 mg/L	15	11	73.3	根粗壮但基部愈伤组织多

2.4 毛葡萄试管苗脱毒效果

葡萄的病毒主要是卷叶病毒和扇叶病毒^[8],毛葡萄属于山葡萄^[3],其病毒和葡萄相似。因此本实验将脱毒试管苗送广西农业科学院重点实验室用分子生物检验法对毛葡萄主要病毒卷叶病毒和扇叶病毒进行脱毒检验,检验结果表明脱毒率达 100%,见图 1(a)、(b)。

2.5 脱毒试管苗的移栽

试管苗移栽前,将有 3~4 cm 高的生根苗培养瓶在室内常温下炼苗 7 d,揭去棉塞再锻炼 6 d,小心取

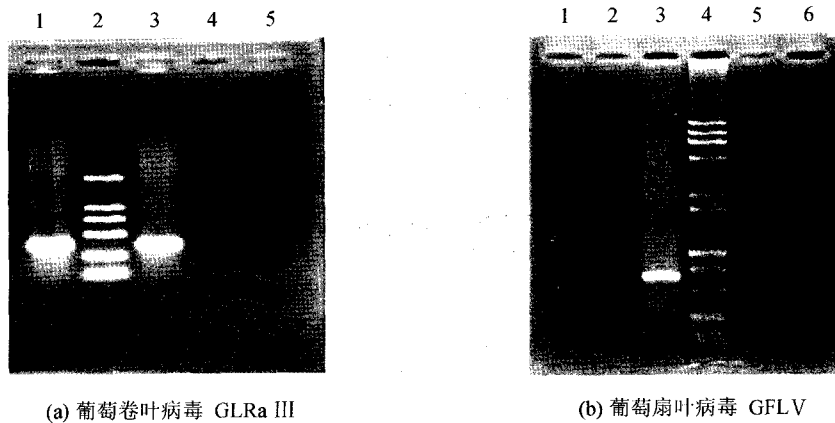


图1 毛葡萄卷叶病毒和扇叶病毒脱毒检验结果

Fig.1 Test results of roll-leave virus III and fan-leaf virus in *V. quinquangularis* Rehd

- a. 1和3为感病葡萄样品,2为Marker(相对分子质量从上至下为:2 000、1 000、750、500、250、100 bp);4和5为组培脱毒苗样品。
b. 1、2、5和6为组培脱毒苗样品,3为感病葡萄样品,4为Marker(相对分子质量从上至下为:15 000、10 000、7 500、5 000、2 500、2 000、1 000、750、500、250、100 bp)。

出试管苗,用自来水洗净根系上的培养基,然后将苗移栽到蛭石和珍珠岩(体积比1:1)为基质的营养钵中,保持湿润,上覆盖黑色塑料薄膜,1周后揭开薄膜^[9],移栽成活率达90%以上。

3 讨论

毛葡萄属于山葡萄^[3],其病毒和葡萄相似,主要是卷叶病毒和扇叶病毒,其对葡萄的感染导致葡萄产量下降,品质变劣,严重时甚至整株枯死^[8]。葡萄脱毒的方法主要有茎尖微芽嫁接技术、高温和低温处理脱毒技术、茎尖培养脱毒法、热处理结合茎尖培养脱毒技术、化学处理脱毒技术等^[6],但迄今为止在毛葡萄上没有利用单种技术获得脱毒苗的报道。

热处理脱毒法是采用适当的温度和处理时间,使寄主体内的病毒浓度降低或失活,从而达到脱毒的目的;茎尖培养脱毒法则是利用植物组织培养技术,切取茎尖进行培养而达到脱除病毒的目的。但单纯的热处理与单纯的茎尖培养均不能完全脱除病毒,且条件要求高,操作困难。本实验采用变温热处理(白天37℃,晚上22℃),在钝化病毒复制的同时,提高了试管苗存活率和脱毒效果;同时在解剖镜下,剥取0.8~1.0 mm的茎尖接种于B₅+BA 0.5 mg/L+IAA 0.1 mg/L培养基中,保证了茎尖的成活率,达到了脱毒的效果。实验说明,变温热处理结合微茎尖培养是毛葡萄组培苗脱毒行之有效的方法。

参 考 文 献:

- [1] 张福平. 粤东地区野生葡萄植物资源及其开发利用[J]. 中国野生植物资源, 2004(6):12-13.
- [2] 彭宏祥,刘荣光. 桂西岩溶山区野生葡萄资源与繁殖技术[J]. 西南农业学报, 1999(4):101-105.
- [3] 邹喻,莫磊兴,林贵美,等. 野生毛葡萄茎段离体培养和生产应用研究[J]. 广西农业科学, 1998(4):196.
- [4] 邹喻,林贵美. 毛葡萄产业化组培育苗技术研究[J]. 西南农业学报, 2003(3):65-68.
- [5] 王以红,吴幼媚,蔡珍,等. 野生毛葡萄芽器官离体培养的研究[J]. 广西林业科学, 1998(1):9.
- [6] 朱世民,邓建民. 葡萄病毒病与脱毒技术[J]. 湖南农业科学, 2003(2):49-50.
- [7] 张玉满,田砚亭,罗晓芳. 葡萄微茎尖培养及葡萄扇叶病毒的ELISA和探针检测[J]. 北京林业大学学报, 1998, 20(4): 54.
- [8] 董凤,张尊平,张少瑜. 我国葡萄病毒病研究进展与发展方向[J]. 中国果树, 2003(6):48.
- [9] 王任翔,高成伟,李洁荣,等. 欧林达夏橙组织培养研究[J]. 广西师范大学学报:自然科学版, 2003, 21(2):71-74.

Techniques of De-Virus of *Vitis quinquangularis* Rehd on Tissue Culture

SHI Gui-yu, CHEN Geng-yun, LIAO Wen-xue

(College of Life Science, Guangxi Normal University, Guilin 541004, China)

Abstract: Taking the major cultivars named Jiulong No. 2 as the explant induce rootless plantlet in order to study techniques of viruses elimination and plant regeneration. The results showed that the survival rate could reach to 80% and the de-virus rate could achieve to 100%, if the cultivars were cultivated with poikilothermic treatment—the stem apex (length: 0.8~1.0 mm) of cultivars should be cultivated in culture medium ($B_5 + BA$ 0.5 mg/L + IAA 0.1 mg/L), being kept for 10~15 d at 37 °C for 8 h (strength of illumination: $40 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) in the daytime, and 22 °C for 16 h at night. The optimum effect of buds inducing was $1/2 \text{ MS} + BA$ 0.2 mg/L + IAA 0.6 mg/L, which could make the rate of rooting reach 86.7%.

Key words: *V. quinquangularis* Rehd; elimination of viruses; plantlets regeneration

(责任编辑 马殷华)