

酿酒葡萄“赤霞珠”叶片和叶柄离体再生系统建立的研究^{*}

王 华¹, 崔福君¹, 张继澍²

(1 西北农林科技大学 葡萄酒学院, 陕西 杨凌 712100;

2 西北农林科技大学 生命科学学院, 陕西 杨凌 712100)

[摘 要] 以赤霞珠叶片、叶柄为材料, 研究了细胞分裂素(TDZ)、不同基本培养基、叶柄砧有无对其不定芽再生的影响。结果表明: TDZ 对赤霞珠离体叶片、叶柄不定芽再生有诱导作用, 对叶片、叶柄的最高诱导率分别为 18.06% 和 28.57%; 叶片再生的最佳培养基为 MS+TDZ 4.0 mg/L, 叶柄再生的最佳培养基为 MS+TDZ 4.0 mg/L+NAA 0.01 mg/L, 叶片不定芽生根培养基为 1/2 MS+BA 1.0 mg/L+20 g/L 蔗糖。

[关键词] 赤霞珠; TDZ; 叶片; 叶柄; 不定芽

[中图分类号] S663.1

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2004)08-0049-04

建立高效的葡萄再生系统是开展葡萄基因工程育种的前提。葡萄再生系统的建立目前有两条途径, 即器官发生途径和体细胞胚再生途径, 主要从花药、叶柄和叶片再生不定芽和诱导体细胞胚^[1~3]。与圆叶葡萄、沙地葡萄相比, 欧洲葡萄再生普遍困难, 而且不同基因型之间存在明显差异, 诱导率普遍较低^[4,5]。

建立良好的葡萄繁殖体系和再生体系的主要工作之一是选择最佳培养基, 对于葡萄离体培养, 国内外通常采用 MS、B₅、NN 等培养基。培养基可提供外植体生长、分化所需的各种营养成分, 所以培养基的成分及配比对外植体的再生有决定性作用。

不同类型的外植体如叶片、叶柄、胚轴、茎尖和花药等在离体培养时对各种培养基或培养条件的要求不同。Stamp 等^[6]对不同叶序的叶片再生率进行了研究, 发现茎尖附近最幼嫩的叶片不定芽再生率高, 而其下部叶片再生率较低。

Thidiazuron (TDZ) 是一种新的棉花脱叶剂。Mok 等^[7]首先发现 TDZ 具有细胞分裂素活性。自 20 世纪 80 年代中期, TDZ 被广泛用于植物组织培养, 在苹果、枣、番木瓜、香椿、榕树等获得了较好的效果^[8~12]。本文对酿酒葡萄“赤霞珠”叶片和叶柄离体再生系统建立的效果进行了研究, 以期酿酒葡萄离体繁殖提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材 料

赤霞珠茎尖、叶片、叶柄。

1.2 方 法

1.2.1 无菌繁殖体系的建立 将赤霞珠幼嫩茎尖从大田取回, 用自来水冲洗数次, 以体积分数 70% 的酒精浸泡 30 s, 用无菌水冲洗 3 次; 加入适量的体积分数为 0.1% 的升汞(氯化汞)溶液, 处理 5~6 min; 无菌蒸馏水彻底冲洗残留的升汞; 接种于繁殖培养基上, 在 25~27℃, 2 000 lx 条件下培养。一旦发现部分外植体有污染, 及时将未污染的外植体转移至新鲜的同样成分的培养基中继续培养。

1.2.2 再生体系的建立 从建好的无菌培养体系中选取合适的叶片, 每叶留 2 mm 长的叶柄砧, 将叶片切成 2 mm×3 mm 方块(主脉在中间, 带叶柄), 正面朝下平放于培养基表面; 叶柄剪成约 0.5 cm 的小段, 同样平放于培养基表面。

1.2.3 再生芽诱导率的统计方法 叶片在再生培养基上培养约 5 周, 统计外植体数和再生不定芽的外植体数, 计算再生芽诱导率。再生芽诱导率(%)=(再生不定芽的外植体数/被调查外植体数)×100%。

^{*} [收稿日期] 2003-06-26

[基金项目] 陕西省科技厅项目(2002C110)

[作者简介] 王 华(1959-), 女, 河北阜城人, 教授, 硕士生导师, 主要从事葡萄与葡萄酒研究。

2 结果与分析

2 1 TDZ 和NAA 组配对赤霞珠叶片愈伤组织诱导及不定芽再生的影响

以MS 为基本培养基, 采用正交试验设计 $L_9(3^4)$, 研究 TDZ,NAA 两种生长调节物质对赤霞

珠叶片愈伤组织诱导及不定芽再生的影响。由表 1 可知, TDZ 在赤霞珠愈伤组织诱导和不定芽再生中起决定性作用, 在 TDZ 为 4 mg/L 时再生芽诱导率最高, 为 18 06%。因此可以认为, MS+ TDZ 4 mg/L 培养基适合赤霞珠离体叶片愈伤组织诱导和不定芽再生。

表 1 不同质量浓度的 TDZ 和NAA 对赤霞珠叶片愈伤组织诱导及不定芽再生的影响

Table 1 Effect of TDZ,NAA on calli induction and adventitious buds regeneration from Cabernet Sauvignon leaves *in vitro*

试验编号 Trial number	TDZ/ ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	NAA/ ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	再生芽诱导率/% Regener- ation bud rate	试验编号 Trial number	TDZ/ ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	NAA/ ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	再生芽诱导率/% Regener- ation bud rate
1	1	0	0	6	4	0 05	6 67
2	2	0	6 67	7	1	0 1	3 33
3	4	0	18 06	8	2	0 1	7 77
4	1	0 05	6 67	9	4	0 1	10 00
5	2	0 05	4 44				

各处理中愈伤组织量均较大, 每个叶片出现不定芽丛 1~ 4 个不等, 芽丛一般从愈伤组织产生, 也有少量从叶片和叶柄砧直接产生。将芽丛转移到继

代培养基MS+ BA 1.5 mg/L + NAA 0.02 mg/L 上进行继代培养, 40 d 后从芽丛处长出 5~ 8 棵再生芽(图 1, 图 2)。



图 1 赤霞珠离体叶片不定芽再生
Fig. 1 Adventitious buds regeneration from Cabernet Sauvignon leaves *in vitro*

表 2 不同质量浓度 TDZ 对赤霞珠离体叶片不定芽再生的影响

Table 2 Effect of TDZ different concentration on adventitious buds regeneration from Cabernet Sauvignon leaves *in vitro*

TDZ/ ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	再生芽诱导率/% Regeneration bud rate
1 0	0 0
2 0	6 67
4 0	18 06
6 0	13 6
8 0	14 2

2 2 不同 TDZ 质量浓度对赤霞珠叶片不定芽再生的影响

根据 TDZ,NAA 正交试验结果, 对 TDZ 作单因素变化实验, 以MS 为基本培养基。观察表明, 当



图 2 赤霞珠离体叶片不定芽增殖
Fig. 2 Adventitious buds proliferation from Cabernet Sauvignon leaves *in vitro*

TDZ 质量浓度分别为 1 0, 2 0, 4 0, 6 0, 8 0 mg/L 时, 各处理中愈伤组织量均较大, 由再生芽诱导率分别为 0, 6 67%, 18 06%, 13 6%, 14 2% (表 2) 可知, TDZ 为 4.0 mg/L 时, 不定芽再生效果较好, 也较稳定。

2 3 TDZ,NAA 对赤霞珠叶柄愈伤组织诱导及不定芽再生的影响

以MS 为基本培养基, 采用正交试验设计 $L_9(3^4)$, 研究 TDZ,NAA 两种生长调节物质对赤霞珠叶柄愈伤组织诱导及不定芽再生的影响。从表 3 可以看出, TDZ 为 4 mg/L , NAA 为 0.01 mg/L 时, 赤霞珠叶柄的再生芽诱导率最高, 为 28 57%。

再生不定芽以芽丛状态出现(图 3), 主要从叶柄两端再生。将芽丛转移到继代培养基MS+

BA 1.5 mg/L + NAA 0.02 mg/L 上进行继代培养, 40 d 后从芽丛处长出 3~ 4 棵再生芽(图 4)。

表 3 不同质量浓度的 TDZ 和 NAA 对赤霞珠叶柄愈伤组织诱导及不定芽再生的影响

Table 3 Effect of TDZ,NAA on calli induction and adventitious buds regeneration from Cabernet Sauvignon petioles <i>in vitro</i>				
试验编号 Trial number	TDZ/ (mg · L ⁻¹)	NAA/ (mg · L ⁻¹)	愈伤组织诱导率/% Calli induction rate	再生芽诱导率/% Regeneration bud rate
1	4.0	0.0	77.5	5.00
2	6.0	0.0	100.0	0.0
3	8.0	0.0	71.4	0.0
4	4.0	0.01	85.7	28.57
5	6.0	0.01	42.9	0.0
6	8.0	0.01	81.9	0.0
7	4.0	0.03	61.9	0.0
8	6.0	0.03	81.9	0.0
9	8.0	0.03	100.0	14.28

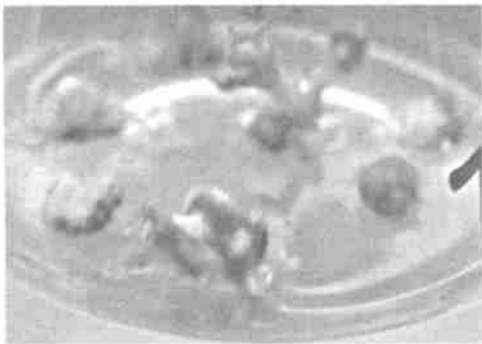


图 3 赤霞珠离体叶柄不定芽再生
Fig. 3 Adventitious buds regeneration from Cabernet Sauvignon petioles *in vitro*



图 4 赤霞珠叶柄再生不定芽增殖
Fig. 4 Adventitious buds proliferation from Cabernet Sauvignon petioles *in vitro*

2.4 叶柄砧有无对不定芽再生的影响

同一植物不同组织再生能力往往不同。本试验以 MS 为基本培养基, 细胞分裂素 TDZ 为 4.0 mg/L 时研究叶柄砧的有无(有叶柄砧指叶片基部并带有 2 mm 叶柄; 无叶柄砧指叶片中前部)对赤霞珠叶片不定芽再生的影响。结果表明, 两种情况下愈伤组织量均较大, 但叶柄砧的有无对赤霞珠离体叶片不定芽再生影响很大, 有叶柄砧的诱导率为 25.00%, 无叶柄砧的诱导率为 5%, 前者比后者高 20%。

2.5 基本培养基对赤霞珠叶片愈伤组织诱导及不定芽再生的影响

本试验选择了 4 种基本培养基, 分别为 MS, NN, 1/2MS 和 B₅。MS 培养基无机盐浓度高, 营养丰富, 微量元素种类齐全, NN 和 B₅ 培养基硝酸钾含量高, 铵态氮含量低, 盐酸硫胺素含量高。结果(表 4)表明, MS 基本培养基对赤霞珠叶片愈伤组织诱导率和再生芽诱导率均为最高, 分别为 93.3% 和 18.1%, 说明无机盐浓度高有利于愈伤组织和不定芽的再生。

表 4 赤霞珠叶片在不同基本培养基上再生芽诱导的比较

Table 4 Comparison about calli induction and adventitious buds regeneration from Cabernet Sauvignon leaves in different basic culture medium

基本培养基 Basic culture medium	愈伤组织诱导率/% Calli induction rate	再生芽诱导率/% Regeneration bud rate
MS	93.3	18.1
NN	85.0	7.5
1/2MS	67.5	2.5
B ₅	92.5	10.0

2.6 离体叶片不定芽生根

以 1/2MS + 20 g/L 蔗糖为基本培养基, 研究 BA 质量浓度变化对赤霞珠增殖茎尖生根的影响。结果(表 5)表明, 随 BA 质量浓度提高, 增殖芽生根率提高。当 BA 为 0.5 mg/L 时, 生根率为 48.1%; BA 为 1.0 mg/L 时, 生根率提高到 82.8%, 且单芽根数最多, 单芽根数和平均根长均高于 0.5 mg/L BA。因此可以认为, 1/2MS + BA 1.0 mg/L + 20 g/L 蔗糖培养基适合赤霞珠叶片不定芽生根。

表 5 赤霞珠离体叶片不定芽生根的诱导

Table 5 Adventitious buds rooting of Cabernet Sauvignon leaves

BA / (mg · L ⁻¹)	生根率/% Introduction rate	单芽根数 Root numbers/per	平均根长/cm Root length/per
0.5	48.1	6.7	0.8
1.0	82.8	6.9	1.2

3 结 论

1) 本研究获得了赤霞珠离体叶片再生的最佳培养基,为MS+TDZ 4.0 mg/L,此时再生效果最好,再生芽诱导率为 18.06%。同时发现叶片基部(并带有 2 mm 叶柄砧)不定芽再生率比中前部高,这可能是由于叶片基部(带叶柄砧)的维管束密度大,有利于营养物质和激素的运输,从而促进了再生。

2) 本研究获得了赤霞珠离体叶柄再生不定芽的

最佳培养基,为MS+TDZ 4.0 mg/L+NAA 0.01 mg/L,其再生芽诱导率为 28.57%,同时获得了赤霞珠离体叶片不定芽生根的培养基配方为 1/2MS+BA 1.0 mg/L+20 g/L 蔗糖。

3) 本研究结果表明,MS 为赤霞珠叶片组织培养的最适培养基。MS 培养基无机盐浓度高,营养丰富,微量元素种类齐全,使赤霞珠离体叶片的再生芽诱导率最高,说明无机盐浓度高有利于愈伤组织和不定芽的再生。

[参考文献]

[1] Elisabeth C, Paul B, Bernard W. Plant regeneration by organogenesis in Vitis rootstock species[J]. Plants Cell Report, 1990, 8: 726- 729

[2] James A S, Shelia M C, Carole P M. Improved shoot organogenesis from leaves of grape[J]. J Amer Soc Hort Sci, 1990, 115(6): 1038- 1042

[3] Jean-Pierre Peros, Laurent Torregrosa, Gilles Berger. Variability among vitis vinifera cultivars in micropropagation, organogenesis and antibiotic sensitivity[J]. Journal of Experimental Botany, 1998, 49(319): 171- 179

[4] 李 云, 冯 惠, 田砚亭. 葡萄再生系统研究进展[J]. 生物技术通报, 2000, (2): 28- 31

[5] 李 云, 冯 惠, 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

[6] Stamp J A, Colby S M. Improved shoot organogenesis from leaves of grape[J]. J Amer Soc Hort Sci, 1990a, 115(6): 1038- 1042

[7] Mok M c, Mok D W S, Shudo K, et al. Cytokinin activity of N-phenyl-N-1, 2, 3-thiadiazol-5-ylurea (thidiazuron) [J]. Phyto Chem, 1982, 21: 1509- 1511

[8] 张志宏, 景士西, 王关林. TDZ 对苹果叶片离体再生不定芽的效应[J]. 植物生理学通讯, 1997, 33(6): 420- 423

[9] 朱忠荣, 杨业正, 冯道霞. TDZ 对枣子离体培养繁殖的影响[J]. 贵州农学院学报, 1997, 16(1): 8- 10

[10] 周俊彦, 张宗勤. Thidiazuron 对榕树离体繁殖的影响[J]. 植物学报, 1992, 34(11): 889- 892

[11] 周俊彦, Collet G F. Thidiazuron 的细胞分裂素活性研究[J]. 西北植物学报, 1989, 9(4): 203- 211

[12] 张小红, 张红燕, 武 军, 等. TDZ 对香椿愈伤组织诱导及芽增殖生长等的影响[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2002, 30(5): 35- 39

A dventitious bud regeneration from leaf and petiole of “Cabernet Sauvignon ”

WANG Hua¹, CUI Fu-jun¹, ZHANG Ji-shu²

(1 College of Enology, Northw est Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China;
2 College of Life Sciences, Northw est Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: In this paper, using the leaves and petioles of “Carbernet Sauvignon ” as the materials, we studied the action of TDZ on the adventitious bud regeneration. The result indicated that TDZ had effect on the adventitious buds induction of “Carbernet Sauvignon ”. A dventitious bud regenerating rate from leaf and petiole is 18.06% and 28.57%, respectively. The optimum medium for adventitious bud regeneration from leaf is MS+TDZ 4.0 mg/L, and the optimum medium for petiole is MS+TDZ 4.0 mg/L+NAA 0.01 mg/L. The best rooting culture medium for leaf adventitious buds is: 1/2 MS+BA 1.0 mg/L+20 g/L sugar.

Key words: Carbernet Sauvignon; TDZ; leaf; petiole; adventitious bud