

‘红地球’葡萄叶片、叶柄不定芽再生体系的建立

李云 冯慧* 田砚亭

(北京林业大学生物科学与技术学院, 北京 100083)

摘要: 探讨了多种因素对‘红地球’葡萄试管苗叶片、叶柄不定芽再生的影响, 叶片再生与生长调节物质种类和浓度、叶片着生部位等因子有关, 叶片不定芽再生的最佳培养基为 $NN_{69} + BA 2.0 \sim 2.5 \text{ mg/L} + IBA 0.2 \text{ mg/L}$, 不定芽再生率以顶端第 1 片幼叶最高。

关键词: 葡萄; 再生系统; 不定芽

中图分类号: S 663.1 文献标识码: A 文章编号: 0513-353X (2002) 01-0060-03

1 目的、材料与方法

葡萄再生较困难, 仅有少量的葡萄品种获得转基因植物, 其中主要是野生葡萄砧木品种^[1]。因此, 只有建立高效的葡萄再生体系, 才有可能促进葡萄栽培品种分子育种的发展。

在春季晴天下午取 3 年生‘红地球’葡萄 (*Vitis vinifera* L. ‘Redglob’) 新抽生的嫩梢, 剪成带单芽的茎段, 先用 70% 酒精溶液浸泡处理 30 s, 无菌水冲洗 1 遍后, 用 0.1% 的氯化汞溶液进行表面灭菌 2~6 min (具体时间视茎段的幼嫩程度而定), 建立无菌培养体系。剪取生根试管苗植株顶端叶 3 片, 每叶留约 0.5 mm 长的叶柄 (下称叶柄砧), 然后从叶片一侧将叶片剪到叶片主脉处至主脉割断为止, 远轴面朝上平放于培养基表面; 叶柄剪成约 0.5 cm 大小的小段, 同样平放于培养基表面。①叶片再生培养基: NN_{69} (或 B_5) + $BA 1.5 \sim 10.0 \text{ mg/L} + IBA/2, 4D 0 \sim 0.6 \text{ mg/L} + \text{糖 } 30 \text{ g/L}$ 。②用于再生幼芽分化培养的培养基: $B_5 + BA 0.6 \text{ mg/L} + IAA 1.0 \text{ mg/L} + \text{糖 } 20 \text{ g/L}$ 。③生根培养基: $1/2B_5 + IAA 0.5 \text{ mg/L} + \text{糖 } 20 \text{ g/L}$ 。上述培养基琼脂用量为 5~6 g/L, pH 6.0 左右。叶片黑暗培养 1 个月后, 再将其置于散射光 (约 1000 lx) 下培养 1 个月, 每天光照 10 h, 培养温度为 $(25 \pm 2) \text{ }^\circ\text{C}$ 。

2 结果与分析

2.1 试管苗叶片、叶柄愈伤组织及不定芽形成

接种后 10 d, 叶龄较高的叶片卷曲、膨大、变脆, 叶龄较低的叶片膨大、伸长, 从叶柄砧及叶片割伤处开始形成嫩绿色晶莹剔透的颗粒状愈伤组织。20 d 后愈伤组织直径可达 1 mm, 2 个月后最大, 形成致密的绿色颗粒状愈伤组织, 直径可达 1.5 cm。叶片、叶柄培养 1 个月后转接一次, 并由暗处移至散射光处培养。叶片培养 1 个月后, 从叶尖、叶脉割伤处或叶柄砧处开始形成较多的变形小叶, 其中仅部分可陆续伸长成为正常的芽, 每个叶片外植体上长出的不定芽的数量从 1 到 4 个不等, 其余逐渐萎缩、死亡, 该结果与 Tang 的结论^[3]相符。叶柄愈伤组织的形成速率快于叶片, 培养 20 d 后可覆盖整个叶柄, 此时叶柄的极性下端长出肉质白色丛生芽, 待约 2 cm 高时, 转接于分化培养基或生根培养基中, 均生长不正常。

2.2 基本培养基对叶片、叶柄不定芽再生的影响

生长调节物质采用 $BA 2.0 \text{ mg/L}$ 和 $IBA 0.02 \text{ mg/L}$ 组合, 培养 30 d。由表 1 可知基本培养基的种类对不定芽诱导的影响极显著, 只有 NN_{69} 培养基中才可产生叶片不定芽, 而叶柄不定芽则仅产生于

收稿日期: 2001-04-09; 修回日期: 2001-07-05

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (39770632)

* 现工作单位: 北京市园林科学研究所, 100102。

B₅ 培养基中。3 种基本培养基中均可诱导出绿色颗粒状愈伤组织, MS 培养基诱导产生的量最多, 并且其无机盐浓度最高, 说明无机盐浓度高有利于葡萄愈伤组织的产生。

表 1 基本培养基对诱导叶片、叶柄不定芽的影响

Table 1 Effect of basic medium on the inducing Adventitious bud from leaf and petiole

基本培养基 Basic medium	叶片不定芽再生率 Adventitious bud regenerating rate from leaf (%)	愈伤组织量 Callus from leaf	叶柄不定芽再生率 Adventitious bud regenerating rate from petiole (%)	叶柄愈伤组织量 Callus from petiole
MS	0 (0/461)	少 Little	0 (0/434)	多 More
B ₅	0 (0/486)	很少 Less	2.5 (11/442)	少 Little
NN ₆₉	12.5 (56/448)	很少 Less	0 (0/507)	很少 Less

注: 不定芽再生率为产生不定芽的外植体占接种外植体总数的百分率, 接种后两个月观察结果, 中间转接 1 次 (下同)。

Note: Regenerating rate of adventitious buds is the ratio of the number of explants which can regenerate adventitious buds and the number of all explants incubated. The results were investigated after the explants had been incubated for two months, during the period the explants incubated were subcultured two times.

2.3 不同浓度的 BA 和 IBA 组配对叶片、叶柄不定芽再生及愈伤组织的影响

根据上述试验, 以 NN₆₉ 为基本培养基, 采用正交试验设计 L₉ (3⁴), 研究 BA、IBA 两种生长调节物质浓度对培养 30 d 的顶端叶片、叶柄不定芽再生及愈伤组织的影响。由表 2 可知, 随 IBA 浓度升高, 愈伤组织量增加。BA 在 2.0 ~ 5.0 mg/L 之间, IBA 在 0.1 ~ 0.5 mg/L 之间, 均可从叶片和叶柄中诱导出绿色颗粒状愈伤组织。当 BA 达 10.0 mg/L 时, 不仅从叶片诱导出的愈伤组织量少, 而且愈伤组织有变褐现象, 虽然叶柄愈伤组织仍为黄绿色, 但与从叶片诱导出的愈伤组织一样, 均未能诱导出不定芽。在 BA 为 5.0 mg/L 时, 约有 25% 的外植体仅产生变形小叶, 并未能伸长。而在 BA 为 2.0 mg/L, IBA 为 0 或 0.1 mg/L 时都诱导出了可伸长的正常不定芽。

表 2 不同生长调节物质浓度对叶片、叶柄不定芽再生及愈伤组织的影响

Table 2 Effect of BA and IBA on the inducing Adventitious bud from leaf and petiole

试验号 Trial number	BA (mg/L)	IBA (mg/L)	叶片愈伤组织 Calus from leaf	叶片不定芽再生率 Adventitious bud regenerating rate from leaf (%)	叶柄愈伤组织 Calus from petiole	叶柄不定芽再生率 Adventitious bud regenerating rate from petiole (%)
1	2.0	0	没有 None	9.0(19/211)	没有 None	0
2	2.0	0.1	很少 Less	16.7(34/203)	少量 Less	0
3	2.0	0.5	多 More	0(0/208)	多 More	0
4	5.0	0	没有 None	0(0/190)	没有 None	0
5	5.0	0.1	少量 Little	0(0/210)	少量 Less	0
6	5.0	0.5	多 More	0(0/204)	多 More	0
7	10.0	0	没有 None	0(0/221)	没有 None	0
8	10.0	0.1	很少 Less	0(0/217)	很少 Less	0
9	10.0	0.5	少量 Little	0(0/225)	很少 Less	0

2.4 不同浓度的 BA 对叶片不定芽再生的影响

根据上述试验结果, 固定 IBA 浓度为 0, 研究不同 BA 浓度 1.5、2.0、2.5、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0 mg/L 对培养 30 d 的顶端叶片不定芽再生的影响, 在每个浓度的处理中均接种叶片 200 片。结果为 BA 浓度在 2.0~2.5 mg/L 之间能够诱导出可正常伸长的不定芽, 以 2.5 mg/L 时再生率最高, 达 11%。但当 BA 的浓度高于或等于 3.0 mg/L 时, 再生率为 0, 可诱导出约 25% 的变形卷曲小叶, 且此种变形小叶不能进一步伸长。

2.5 不同 IBA 浓度对叶片不定芽再生的影响

取 BA 为 2.0 mg/L, 研究不同的 IBA 浓度 (0~0.5 mg/L) 对培养 30 d 的顶端叶片不定芽再生的影响, 每个浓度处理接种叶片 200 片, 结果诱导叶片不定芽再生的最佳 IBA 浓度为 0.2 mg/L, 此时的

再生率最高, 达到 22%。综合上述试验结果可知, 诱导红地球葡萄叶片不定芽再生的最佳生长调节物质浓度组合为 BA 2.0~ 2.5 mg/L, IBA 0.2 mg/L。

2.6 不同叶位对叶片不定芽再生的能力

取生长 30 d 的健康生根试管苗, 从茎尖刚展开的幼叶往下按叶序依次标记为 1, 2, 3……8。本试验对前 3 片嫩叶、中部叶 (叶序约为 5) 及下部叶 (叶序约为 8) 的再生能力进行研究, 每部位的叶片接种 200 片。结果叶片位置对不定芽再生的影响非常明显, 不定芽再生率随叶序位置的下降而降低, 第 1 片叶片不定芽再生率最高, 达 33%; 第 2、3 片分别为 23% 和 15%, 从中部叶片开始到下部叶片无任何不定芽产生, 因此幼龄叶片具有较强的形态发生能力。Stamp 等^[3]报道葡萄茎尖附近的幼嫩叶片不定芽的再生率远高于下部叶片, 本试验结果再次证实了这一结论。

在叶片不定芽的诱导过程中还发现, 诱导出不定芽的叶片产生愈伤组织极少, 不定芽几乎直接产生于叶柄砧及叶脉割伤处, 而未诱导出不定芽的叶片则产生了较多的愈伤组织。因此, ‘红地球’葡萄叶片再生时应避免诱导愈伤组织, 以直接从叶片上诱导不定芽为好。

参考文献:

- 1 李 云, 冯 慧, 田砚亭. 葡萄遗传转化研究进展. 生物工程进展, 2000, 20 (3): 49~ 52
- 2 Tang F A, Mullins M G. Adventitious bud formation in explants of some grapevines rootstock and scion cultivars. *Vitis*, 1990, 29: 151~ 158
- 3 Stamp J A, Colby S M. Improved shoot organogenesis from leaves of grape. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 1990, 115 (6): 1038~ 1042

Study on ‘Red Globe’ Grape Leaf and Petiole Adventitious Bud Regenerating System

Li Yun, Feng Hui, and Tian Yanting

(College of Biology and Biotechnology, Beijing Forestry University, Beijing 100083)

Abstract It is necessary to establish an efficient regenerating system before genetic transformation of grapevine. In this study, an efficient regenerating system was established. Adventitious buds were obtained from the leaves of ‘Red Globe’ (*Vitis vinifera* L.), and the factors that affect adventitious bud regeneration were studied. The regenerating rate of adventitious bud had relationship with the kinds and the concentration of plant growth regulator, leaf position, etc. The optimum medium for adventitious bud regeneration was found, which is NN69+ BA 2.0- 2.5 mg/L+ IBA 0.2 mg/L. The regenerating rate of the adventitious bud from the first top leaf was the highest.

Key words: Grape; Regenerating system; Adventitious bud

新书推荐

《葡萄学》 贺普超主编

中华农业科教基金资助图书。该书分为绪论和 26 章。分别介绍了葡萄的分类和种质资源、形态与解剖、中国葡萄栽培区划、葡萄生理、主栽品种、繁殖、葡萄园的建立、整形修剪、土肥水管理、抗寒与设施栽培、葡萄主要性状的遗传、杂交与实生育种、多倍体育种、无性系选种、组织培养、病虫害、葡萄酒、葡萄的贮藏保鲜等重要内容。可供高校师生和研究工作者以及葡萄生产者阅读参考。

定价: 141.00 元 (含邮费)

购书者请通过邮局汇款至北京中关村南大街 12 号中国农科院蔬菜花卉所《园艺学报》

编辑部, 邮编 100081。

