

葡萄茎尖脱毒培养和快速繁殖*

曹为玉 郑燕棠 张福庆 朱海英

(天津市农科院中心实验室,天津 300192)

摘要 经多年试验研究,筛选出适于葡萄茎尖脱毒培养及继代繁殖的广谱性系列培养基。它与一般常用培养基相比,可缩短培养时间 12~19d。该系列培养基对不同葡萄品种的培养效果有一定的差异,但脱毒效果差异不明显,对葡萄扇叶病毒和卷叶病毒的茎尖脱毒率分别达到 86.6% 和 84.4%。试验证明,茎尖的长短与脱毒率成反比,与再生株的存活率成正比。

关键词 葡萄 脱毒 培养基 组织培养

由于累代无性繁殖和盲目引种,葡萄病毒病的蔓延和危害日趋严重。现已查明葡萄受 33 种病毒和类病毒侵害^[1],其中危害最重的是葡萄扇叶病毒和卷叶病毒。据报道,从日本引进的巨峰品种发病率高达 80% 以上^[1],减产 25%~30%^[2],受葡萄卷叶病毒感染后,果实糖度下降 5~6 度,且着色不良^[3]。脱毒处理是目前认为防治果树病毒病的唯一有效措施。Masaniko 1982 年从感染卷叶病毒的“善光寺”切取茎尖,经培养得到了完整的植株,用热处理和组织培养相结合的方法使卷叶病毒的脱毒率达 80%,无病毒果树在美、意、日、法等国家已应用于生产。我国从 1983 年开始研究茎尖培养技术^[4,5],现已在蔬菜、花卉、果树等作物上应用。

现将我们通过茎尖培养获得无病毒葡萄植株及提高脱毒率、缩短培养时间的研究结果报道如下。

1 材料和方法

以复合侵染 GFV、GLRV 的蛇龙珠和单纯感染 GFV 的巨峰、玫瑰香和意大利等品种为茎尖脱毒的培养材料。引进无病毒的白雷司令、赤霞珠、品丽珠等 10 个品种为组培快繁材料。

将采自田间并经病毒检测为感染卷叶病毒和扇叶病毒的幼苗或枝条栽插到花盆里,长出新根后进行热处理,温度控制在白天 38℃、夜晚 35℃,各 12h。经过 60d 左右,从长出的新梢上剪取带有 1~2 个腋芽的茎段,用常规方法消毒后切取 0.2~0.5mm 的茎尖,立即分别接种在以 MS 为主体的 TMA-1、TMA-2、TMA-3 培养基上;待膨大变绿后再分别转接到 TMB-1、TMB-2、TMB-3 培养基上;当分化出若干个畸形小株后剪取移栽到以 B₅ 为主要成份的 TRC 系列的 6 种继代培养基上,选出最适培养基以扩大繁殖。

组培快繁方法采用无病毒单株的带芽茎段,消毒后单芽扦插到 TRC 系列培养基上,置于 26℃±2,光强度 2000lx 的条件下培养,每日光照 12h。待小叶长到 5~6 片叶后即准备进入苗的驯化阶段。

病毒检测采用血清和生物学测定相结合的方法。GLRV 和 GFV 的标准抗血清由美国康奈尔大学 Gonsalves 提供;指示植物为昆诺阿藜、苋色藜、千日红、番杏、豆类 and 烟类等。

2 结果与分析

2.1 茎尖脱毒培养基的筛选

以 MS 为主体的三组茎尖培养基的培养效果有明显差异,其中以 TMA-2、TMB-2 培养基组合的膨大变绿率和畸形小株生成率最高,分别达 58.1%和 48.3%;TMA-3、TMB-3 培养基效果次之;而 TMA-1、TMB-1 培养基效果最差,茎尖膨大变绿率仅达 3%,且无畸形小株形成。结果表明,TMA-2、TMB-2 可做广谱性茎尖脱毒培养基在生产上应用。

表 1 茎尖脱毒培养基主要成分及培养效果 (mg/L)

培养基代号	培养基主要成分							膨大变绿率(%)	畸形小株生成率(%)
	NAA	IAA	IBA	KT	BA	AS	MS(含量)		
TMA-1	0.01	0.4	—	—	0.5	4	1/2	3	
TMB-1	0.5	—	0.100	—	—	—	1/2		0
TMA-2	0.1	—	—	0.5	1	4	1/2	58.1	
TMB-2	—	0.25	—	0.3	0.4	40	1/2		48.3
TMA-3	—	—	0.023	—	2	60	1/4	36.5	
TMB-3	—	—	0.036	—	1	20	1/4		32.3

注:AS 为腺嘌呤的缩写

2.2 不同葡萄品种的培养效果

从表 2 看出,在同一组培养基(TMA-2、TMB-2、TRC-6)上,不同品种的茎尖培养效果有明显差异,“意大利”品种的培养效果最好,茎尖膨大变绿率、畸形小株生成率和一次成苗的成活率分别达 58.1%、48.3%和 64.3%;巨峰的培养效果与意大利近似,蛇龙珠的膨大变绿和一次成苗的效果与上述两个品种差异不大,但畸形小株生成率较低;玫瑰香品种各发育阶段都不理想,明显低于其它品种。

四个供试品种从茎尖培养至成株期所需的时间分别为 101~108d,比国外常用培养基培养时间缩短 12~19d,可以看出利用我们设计的培养基进行茎尖脱毒培养,能大大加快生长发育速度。

从表 2 还可看出复合侵染 GFV 和 GLRV 的蛇龙珠与单纯感染 GFV 的玫瑰香等品种茎尖培养后的脱毒效果差异不明显,均达到 84.8%以上,最高可达 88.1%。

表 2 不同葡萄品种茎尖培养效果和脱毒率的差异

品 种	茎尖培 养个数	发育个数						平生 均株 再数	发育 天数	脱毒率 %	
		TMA-2		TMB-2		TRC-6				GFV	GLRV
		个	%	个	%	个	%				
巨 峰	50	28	56	13	48.4	99	69.2	14	105	84.8	
玫瑰香	52	23	44.2	9	39.1	30	55.6	8	108	86.6	
蛇龙珠	51	27	52.1	11	40.7	56	63.6	12	108	87.5	84.4
意大利	50	29	58.1	14	48.3	135	64.3	18	101	88.1	

2.3 茎尖长度与培养存活率及脱毒率的关系

葡萄茎尖长度与存活率成正相关;与脱毒率成反相关。表 3 结果说明,当切取茎尖长度为 0.2~0.3mm 时,存活率为 21%~38%,GFV 的脱毒率为 91.4%~97%;当切取 0.5mm 以上时,存活率 75%~83%;GFV 的脱毒率仅为 70.6%~76.5%。表 3 还说明不同品种间葡萄茎尖的存活率有较大差异,培养相同长度(0.2~0.3mm)的茎尖时,巨峰和意大利小株存活率达 28%和 38%,而玫瑰香和蛇龙珠仅为 21.1%和 23.5%,脱毒效果品种间差异不甚明显。

表 3 茎尖长度与存活率和脱毒率关系

品 种	茎尖长度 (mm)	总茎尖数 (个)	成活茎尖数 (个)	小株存活率 (%)	GFV 脱毒率 (%)
巨 峰	0.2~0.3	50	14	28	97.14
	0.5	50	41	82	71.4
玫瑰香	0.2~0.3	52	11	21.1	94.4
	0.5	37	28	75.7	74.3
蛇龙珠	0.2~0.3	51	12	23.5	91.4
	0.5	37	29	82.9	70.6
意大利	0.2~0.3	50	15	38	94.3
	0.5	40	32	80	76.5

2.4 继代培养基的筛选和效果

以 B₅ 为主要成分并对生长素和激素成分含量做了适当调整,共设计了 6 个继代培养基配方,经试验筛选出既适用于茎尖生长的畸形小株一次成苗,又适用于不同品种继代繁殖的广谱性培养基 TRC₀,参试的几个品种成株率和成活率分别为 80.2%~84.0%和 82.1%~84.0%。TRC₂ 培养基对意大利品种效果最好,它的成株率和成活率都比较高,分别为 87.1%和 86%,植株表现粗壮,叶片肥厚浓绿,根系发达;对其它几个品种如代号 88-33 和未列入表内的品丽珠、赤霞珠、白雷司令等均不适于生长,植株表现丛生和抑制生长,成株率均在 50%以下。TRC₁ 培养基对上述几个品种基本适用,只是根系细弱,成活率偏低,其它几个继代繁殖培养基不甚理想。

表 4 TRC₀ 和 TRC₂ 培养基的快繁效果

品种 名称	TRC ₀				TRC ₂			
	扦插 个数	成株 个数	成株 率(%)	成活 率(%)	扦插 个数	成株 个数	成株 率(%)	成活 率(%)
玫瑰香	162	130	80.2	82.1	70	35	50	76
巨 峰	70	58	83.4	83.4	345	268	77.7	80
意大利	70	57	82.5	82.5	240	209	87.1	86
88-33	60	52	84.0	84.0	75	34	60.4	70

3 小结和讨论

据贞松光男和 Masaniko^[6]报道,葡萄从茎尖培养到成株期要历经 4 个月的时间,前后需要更换 4 次培养基。与国外相比我们设计的培养基系列可以缩短培养时间 12~19d,而且只需要更换 3 次培养基。由于适当延长茎尖在 TMB-2 培养基上的培养时间,使畸形小株伸长和加粗后直接扦插到 TRC₀ 继代繁殖培养基上并可一次成苗,因而,大大缩短了茎尖的培养时间。

本项研究依据茎尖膨大变绿、芽丛分化和生长三个培养阶段中对生长素和激素浓度的要求不同,适当调配了两者的比例,从而使茎尖培养的生长和发育更趋合理。

首先将 TMA-2 茎尖培养基的 KT 和 BA 的浓度提高到 0.5 和 1mg/L,并降低 NAA 浓度至 0.1mg/L,可抑制顶端优势,促使其膨大变绿并分化出大量芽丛,不至于长成细长茎;然后降低 TMB-2 培养基中的 KT 和 BA 的用量,提高 NAA 浓度至 0.25mg/L,以恢复

芽丛的顶端优势,进而发育成健壮的畸形小株;小株剪下后直接插到含有 NAA (0.22mg/L) 的 TRC₆ 培养基上培养成株。

据有关材料报道^[6],单纯用茎尖培养或热处理的方法进行脱毒,效果均不理想。本研究是把这两种方法结合起来运用于葡萄脱毒苗的培养,以充分发挥各自的脱毒作用。热处理脱毒的机理主要在于高温可以控制病毒增殖并延缓其在植株体内扩散速度;而微尖脱毒则是根据病毒在植物体内分布不均匀,生长点几乎不含有病毒的特点,利用茎尖培养获得脱毒苗。试验结果表明,采用两者相结合的措施,可以获得更好的脱毒效果。

由于葡萄品种特性不同,继代繁殖采用了几个培养基,并进行了比较,取得了较好结果。TRC₁ 对代号为 88-33 和未列入表内的几个品种效果一般;TRC₂ 最适于意大利等品种;TRC₆ 为广谱继代繁殖培养基,对多种葡萄品种均比较适用,其生长素的含量介于上述二培养基之间,说明因品种不同对生长素的需求也不同,所以在配制培养基时应予充分考虑。

茎尖培养,继代繁殖和驯化入园后都要进行病毒跟踪检测,以确保无毒苗的质量。

参 考 文 献

- 1 郭德银. 葡萄组织培养和快速繁殖. 果树科学, 1988, 6(3): 183~188
- 2 钱菊梅. 栽培无病毒种苗防止果树病毒病害扩展蔓延. 植物检疫, 1989, 3(6): 468~471
- 3 贞松光男. 葡萄茎尖培养和病毒的无毒化. 植物防疫, 1987, 41(9): 418~422
- 4 刘培德. 葡萄茎尖培养. 中国果树, 1983(2): 43~46
- 5 黄贞光. 葡萄茎尖培养和脱毒. 果树科学, 1990, 7(1): 13~18
- 6 曹孜义. 木本植物组织培养及应用. 北京: 高等教育出版社, 1986, 328~342

Stem Tip Tissue Virus - free Culture and Rapid Propagation of Grapevine

Cao Weiyu Zheng Yantang Zhang Fuqing Zhu Haiying

(Central Laboratory, Tianjin Academy of Agricultural Sciences, Tianjin)

Abstract A series of broad spectrum media for stem tip tissue virus - free culture and propagation of grapevine was prepared. These media could shorten the culture time by 12 - 19 days as compared with the media used commonly. The series of media appeared different in culture effect on the different grapevine varieties. The elimination effect of the virus in grapevine showed little different with the varieties. The elimination rate of GFV and GLRV from the grapevine stem tip reached up to 86.6% and 84.4%, respectively. The result indicated that the length of the stem tip varied directly with the rate of virus elimination and inversely with the survival rate of the plant.

Key words: Grapevine; Elimination of virus; Medium; Tissue culture