

葡萄试管苗嫁接技术探究

王红力, 文颖强

(西北农林科技大学 园艺学院, 陕西 杨凌 712100)

摘要:通过试验建立起一套适用于葡萄(*Vitis vinifera* L.)试管嫁接的方法。以‘无核白’‘里扎马特’等品种为前期试验材料,通过设置不同的嫁接组合类型进行对比,筛选出成活率最高、最实用的试管嫁接方式以用于其它材料的保存和改良。试管嫁接时选用生长健壮的砧木是首要条件,在此基础上采用“砧木无叶,接穗留叶”的方式能提高嫁接成活率并保证操作效率;锡箔纸具有很好的可塑性,采用锡箔纸对接口进行处理,不仅更加简便,而且更加牢固。在此基础上熟练掌握嫁接技术与组培技能,能大大提高嫁接的成活率。

关键词:葡萄;试管;嫁接;成活率

中图分类号:S663.1 **文献标识码:**A **文章编号:**0488-5368(2021)10-0022-04

Grafting Technology of Grape Plantlets in Vitro

WANG Hongli, WEN Yinqiang

(College of Horticulture of Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: A set of vitro grafting method for grape (*Vitis vinifera* L.) plantlets was established. The cultivars such as ‘Thompson Seedless’ and ‘Rizamat’ were used as preliminary materials. Different grafting combination types were set up to compare, the most practical vitro grafting method with the highest survival rate was screened out for the preservation and improvement of other materials. In the process of vitro grafting, the primary condition was to select the stock with strong growth. On this basis, the method of "rootstock without leaves and scion with leaves" could improve the survival rate of grafting and could ensure the operation efficiency. The use of tin foil for interface processing was not only more simple, but also more solid because the tin foil paper had good plasticity. So mastering of the grafting technology and tissue culture skills can greatly improve the survival rate of grafting.

Key words: Grape plantlets; Vitro; Grafting; Survival rate

葡萄(*Vitis vinifera* L.)既可鲜食,亦可用于酿酒、制汁和制干,且其含有白藜芦醇等有利于防癌、防心血管病、抗衰成分,在世界果品贸易中占有重要的位置^[1]。我国是葡萄属植物的起源中心之一,也是东亚种群的集中分布区,产于我国的葡萄种类约占世界葡萄属植物种类的60%,为现代

葡萄育种提供了丰富的种质基础^[2]。世界主栽欧洲葡萄品种品质优,但其突出缺点是不抗病^[3]。因此,对欧洲葡萄进行抗病改良以提高其抗病性是解决这一生产问题的有效途径^[4]。近年来,分子育种虽然取得一定的成果,但是部分转基因植株生长缓慢且长势差,极大的影响基因功能研究。因此,通

收稿日期:2021-01-23 修回日期:2021-02-10

基金项目:国家自然科学基金项目(31772264)。

第一作者简介:王红力(1996-),男,云南玉溪人,在读硕士研究生,研究方向为农艺与种业。

通信作者:文颖强,男,教授,博士生导师,主要从事葡萄抗病种质创新与遗传改良研究。

过嫁接的手段将转基因植株嫁接到生长健壮的常规品种当中进行培育,以提高转基因植株成活率,从而为葡萄分子育种提供技术支持。

试管嫁接是一种在试管内将砧木与接穗进行嫁接的技术,它是植物组织培养与嫁接技术的结合^[5]。早在1972年,Murashige等^[6]就提出试管嫁接技术,随着该项技术的不断发展,并逐渐运用到苹果、桃、柑桔、葡萄等多种果树研究中。目前,试管嫁接已被广泛应用于快速检测植物病毒^[7]、繁殖保存珍贵育种材料、脱除植物病毒等方面。

与常规嫁接相比,试管嫁接技术除了可以在无菌环境得到无病毒植株以外,还可以提高砧木与接穗之间的亲和力,并可排除时间、土地等因素干扰。试管嫁接与组培快繁一样,具有周期短,条件易于控制,不受季节限制和环境影响等优点^[8]。

1 材料和方法

试验材料为欧洲葡萄品种‘无核白’‘里扎马特’和中国葡萄‘白河35-1’组培苗,以及课题组前期通过基因编辑技术得到的植株。

1.1 嫁接材料的获得

2019年5月在西北农林科技大学葡萄种植资源圃中分别采集‘无核白’‘里扎马特’‘白河35-1’三个品种进行外植体构建。将采集到的材料剪成小段,在流水条件下反复冲洗12h,随后在超净工作台下将材料置于装有10%次氯酸钠溶液的玻璃瓶中进行消毒处理,接着用无菌水冲洗,再用75%酒精再次消毒。洗脱次数视材料情况而定,脱洗次数过少会引起污染,过多则会对材料本身造成严重损害。待生长到一定阶段,将目标材料在无菌条件下进行继代培养、扩繁备用。

1.2 培养基的准备

MS粉,1 mg·mL⁻¹ IAA,1 mg·mL⁻¹ 6-BA以及1 mg·mL⁻¹ NAA,添加蔗糖30 g·L⁻¹,琼脂7 g·L⁻¹;为降低褐化率,加入活性炭1 g·L⁻¹,调节pH至5.8~6.0,在121℃高温高压条件下灭菌20 min后,取出混匀,冷却至凝固备用。

1.3 其他材料的准备

装有滤纸的200 mm培养皿,11号手术刀(0.4 mm刀片),镊子,弯头剪刀,锡箔纸,硅胶管,90 mm培养皿,无菌水。以上材料均需在121℃高温高压下灭菌,取出后放入烘箱烘干备用。

1.4 试管嫁接

1.4.1 试验设计 (1)不同砧木品种比较。以‘白河35-1’为接穗,‘无核白’‘里扎马特’作为砧木进行嫁接成活率的比较。

(2)接口部位的材料选择。选择内径2 mm、外径3 mm的硅胶管,在其侧面剪出一条缝隙,便于操作。用剪刀将锡箔纸剪成长约1 cm、宽约为0.5 cm的条形备用。采用无处理的方式进行对照,待解除束缚后统计成活率,选出最合适的嫁接用材。

(3)接穗和砧木有无叶片对嫁接成活率的影响。以接穗不保留叶片与接穗保留1~2个叶片进行比较(视具体植株而定,若叶片生长较好,则留1片即可;若叶片很小,则留2片)。具体可分为以下4种嫁接方式:接穗留叶砧木无叶;接穗无叶砧木无叶;接穗留叶砧木留叶;接穗无叶砧木留叶。

1.4.2 试管苗嫁接方法 采用劈接法进行。选取生长性状优良、直立的茎段作为砧木。选定后,用弯头剪刀将其剪下,长度不宜过长,一般保持在1~2 cm。选好茎段后,用手术刀(0.4 mm刀片)从茎段纵切面垂直切下,形成0.3~0.5 cm深的切口。在剪断接穗的形态学下端用手术刀切出楔形(若茎段细弱,则将其对应长度用刀刮出伤口即可),随后小心插入准备好的砧木切口中。若此过程所需时间较长时,可将砧木或接穗放入事先准备好的装有无菌水的玻璃皿中保持湿润,避免在操作结束前萎蔫。嫁接操作完成后,对嫁接部位进行束缚(或不作处理),最后将其插入新的培养基中。观察其生长状况,15d后统计成活率。

1.5 结果统计

嫁接成活率/%=(嫁接成活数/总嫁接株数)×100

2 结果与分析

2.1 不同砧木品种对嫁接成活率的影响

两个品种砧木的嫁接成活率如表1所示,以‘无核白’‘里扎马特’为砧木均得到较高成活率。两个品种表型相似,茎段粗壮,根系发达,均适合用来作为嫁接砧木。因此,二者可以互为替代。在对‘白河35-1’进行自根嫁接后,发现成活率较低,原因可能是茎段较软、韧性较差所导致。考虑到长期使用一个品种材料进行嫁接,可能会造成剩余苗木数量对其他工作的资源供应不足,且继代后需要

一定的生长周期,故将前两种材料进行交替使用。

表 1 嫁接成活率比较

组培苗品种	嫁接总数	成活数	成活率/%
无核白	15	13	87
里扎马特	15	12	80
白河 35-1	15	4	27

2.2 接口捆绑材料对嫁接成活率的影响

采用锡箔纸和硅胶管进行处理的嫁接苗成活率均在 70% 以上,而不采用任何处理的嫁接苗成活率则较低,如表 2 所示。造成这种差异性的原因初步分析为在嫁接初期,接穗与砧木还暂时处于半贴合状态,不进行任何处理会使得接穗一旦受到外界的干扰便导致其与砧木错位,甚至从接口处脱落,从而降低了嫁接成活率。使用材料处理可以加固接穗与砧木接口处的贴合状态,促进愈伤组织的形成,加快输导组织的上下连通,以此提高嫁接成活率。在操作过程中,由于硅胶管口径大小固定,在处理直径过小的嫁接苗时很容易造成松动,而锡箔纸则具有很

强的可塑性,更适合用来作为接口处理材料。

表 2 不同接口捆绑材料处理后的嫁接成活率

处理类型	嫁接总数	成活数	成活率/%
锡箔纸处理	15	13	87
硅胶管处理	15	11	73
无处理	15	5	33

2.3 四种不同组合方式对嫁接成活率的影响

嫁接结果如表 3 所示,采用接穗不带叶片、砧木带叶片的嫁接组合成活率最低,二者均不带叶片的组合成活率次之。接穗带有叶片、砧木不带叶片的成活率最高,一个月后的生长状况也最好。造成这种现象的原因可能是由于茎尖段的细胞生长活跃,代谢力较强,可以合成大量促进接口愈合生长的生长素类与细胞分裂素类,更好地促进了嫁接苗的愈合与生长^[9]。而在实际操作中,砧木带有叶片会对整个嫁接过程造成困难,影响了嫁接进度。因此,采用“接穗留叶,砧木无叶”的方式能最大程度地提高成活率。

表 3 4 种不同组合的嫁接成活率及生长情况

组合类型	嫁接总数	成活数	成活率/%	平均株高/cm (一个月)	状态 (一个月)
接穗有叶砧木无叶	15	13	87	5.14	苗子健壮,叶片嫩绿
接穗无叶砧木无叶	15	3	20	3.96	苗子弱小,且有褐化现象
砧木有叶接穗有叶	15	11	73	4.67	苗子健壮,叶片嫩绿, 但砧木叶片出现黄化
砧木有叶接穗无叶	15	5	33	4.03	苗子较弱,砧木叶片出 现黄化萎蔫

2.4 转基因苗嫁接结果

将最优嫁接方式运用到课题组前期通过基因编辑技术得到的 EDR 转基因苗当中,成活率见表 4。由于受部分转基因苗玻璃化现象的影响,部分嫁接苗的成活率会有所降低。

表 4 不同时间转基因苗的嫁接成活率

日期 (月·日)	嫁接总数	成活数	成活率 /%	平均成活率 /%
6·13	15	13	87	
6·25	15	10	67	
7·16	15	8	53	67
7·30	15	12	80	
9·18	15	6	47	

2.5 转基因嫁接苗的生长变化情况

对不同时期的转基因嫁接苗进行株高统计,以普通组培苗为对照,观察比较两者的差异性。所得结果如图 1 所示。可以看出,在前半个月,嫁接苗与组培苗之间几乎无差异;而后半个月,普通组培苗的长势更快。造成这种差异的原因可能是砧木接穗愈合过程较为缓慢,且接穗质量不高所导致。但两个月后,嫁接苗与普通组培苗的生长高度差异较小。因此,当传统继代方式无法发挥作用时,嫁接可作为一种替代的方法对目标植株进行保存培育。

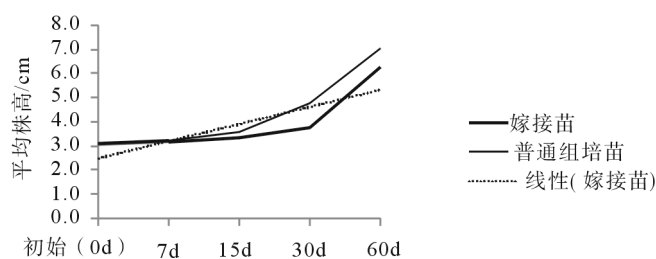


图1 转基因嫁接苗的株高变化趋势

3 讨论与结论

在整个实验探究过程中发现,某些因素对嫁接成活率有着至关重要的影响。赵巍巍等^[10]以梨为材料研究认为,砧木是否带有叶片对嫁接成活率影响不大,但砧木保留叶片时不利于嫁接操作,该观点与本研究结果一致。周瑞金等^[11]在苹果微试管嫁接研究中发现接穗叶片会增大蒸腾面积,且会增加嫁接操作中的难度,从而降低嫁接成活率,但当接穗没有叶片或叶片过少时,接穗又会缺少向上吸收水分和营养的动力。Palma 等^[12]用 *Acacia senegal* 作试验研究的结果表明,离体嫁接时接穗上必须带叶片。因此,接穗上的叶片对试管嫁接成活必不可少。在离体嫁接过程中,对嫁接结合部不进行薄铝片绑束可造成愈合不良^[9];在试管嫁接技术的基础上马云霞等^[13]用试管内离体嫁接快速检测法将离体嫁接植株苗培养 2、3 个月后检测出扇叶症状。刘真真等^[14]通过对石榴试管苗的嫁接,成功解决石榴在遗传转化过程中生根困难的问题,缩短了石榴遗传转化周期。蒋爱丽^[15]通过试管微型嫁接的方式成功解决野生山葡萄生根难的问题。郝新意^[16]运用葡萄微型嫁接手段并结合病毒定位技术成功观察到病毒的转运情况。

通过本试验研究得到一套适合葡萄试管嫁接的方式,为改良、挽救葡萄在分子育种过程中得到的不良性状植株及其相关后续研究工作提供技术支持。选用生长健壮的砧木是首要条件,在此基础上采用“砧木无叶,接穗留叶”的方式能提高嫁接成活率并保证操作效率;锡箔纸具有很好的可塑性,采用锡箔纸对接口进行处理,不仅更加简便,而且更加牢固。在此基础上熟练掌握嫁接技术与组培技能,能大大提高嫁接的成活率。

参 考 文 献:

- [1] 田野,陈冠铭,李家芬,等. 世界葡萄产业发展现状[J]. 热带农业科学, 2018, 38(06): 96-101, 105.
- [2] Wan Y Z, Schwaninger H, Li D, et al. A review of taxonomic research on Chinese wild grapes[J]. *Vitis*, 2008, 47(02): 81-88.
- [3] Brewer M T, Milgroom M G. Phylogeography and population structure of the grape powdery mildew fungus, *Erysiphe necator*, from diverse *Vitis* species [J]. *BMC Evolutionary Biology*, 2010(10): 268.
- [4] 王辰,姚文孔,谢小青,等. 华东葡萄泛素连接酶基因 VpUIRP2 和 VpUIRP3 的抗白粉病特性分析[J]. 果树学报, 2016, 33(12): 1477-1491.
- [5] Estrada-Luna A A, López-Peralta C, Cárdenas-Soriano E. In vitro micrografting and the histology of graft union formation of selected species of prickly pear cactus (*Opuntia*, spp.) [J]. *Scientia Horticulturae*, 2002, 92(03): 317-327.
- [6] Murashige T. A technique of shoot apex grafting and its utilization towards recovering virus-free citrus clones. [J]. *Hortscience*, 1972, 7.
- [7] 吴雅琴,章德明. 用离体微嫁接法快速检测苹果潜隐病毒[J]. 落叶果树, 2001, 33(02): 4-6.
- [8] Lefort P L, Leglise N. Quantitative stock-scion relationships in vine. Preliminary investigations by the analysis of reciprocal graftings [J]. *Vitis -Geilweilerhof-*, 1977(16): 149-161.
- [9] 戴彩虹. 山葡萄组织培养与离体嫁接亲和性研究 [D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2014.
- [10] 赵巍巍,陈蕾,曹后男,等. 梨的试管微嫁接技术研究[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(02): 624-626.
- [11] 周瑞金,杜国强,师校欣,等. 影响转基因苹果试管微嫁接苗成活的因子[J]. 果树学报, 2007, 24(02): 215-217.
- [12] Palma B, Vogt G F, Neville P. A combined in vitro/in vivo method for improved grafting of *Acacia senegal* (L.) Willd. [J]. *Journal of Pomology & Horticultural Science*, 1996, 71(03): 379-381.
- [13] 马云霞. 葡萄扇叶病毒病试管内微嫁接快速检测研究[J]. 河北果树, 1999(03): 10-13.
- [14] 刘真真,赵玉洁,胡青霞,等. 石榴试管嫁接技术研究[J]. 果树学报, 2019, 36(04): 521-528.
- [15] 蒋爱丽. 葡萄试管嫁接技术[J]. 上海农业科技, 1995(06): 36-37.
- [16] 郝新意. 葡萄试管苗微型嫁接组织学、病毒的转运及检测研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2017.