

引文格式: 舒河霖, 曹慧玲, 邵建辉, 等. 马瑟兰葡萄体细胞胚再生体系的建立[J]. 云南农业大学学报(自然科学), 2023, 38(1): 112–121. DOI: [10.12101/j.issn.1004-390X\(n\).202204002](https://doi.org/10.12101/j.issn.1004-390X(n).202204002)

马瑟兰葡萄体细胞胚再生体系的建立*

舒河霖¹, 曹慧玲¹, 邵建辉², 于坤淼¹, 郭盼¹, 马春花^{1**}

(1. 云南农业大学 园林园艺学院, 云南 昆明 650201;

2. 云南农业大学, 云南省高校葡萄与葡萄酒工程技术研究中心, 云南 昆明 650201)

摘要:【目的】建立欧亚种葡萄马瑟兰体细胞胚再生体系, 为其遗传转化体系的建立奠定基础。【方法】以马瑟兰的花蕾和未成熟种子为外植体, 研究 2,4-二氯苯氧乙酸、褪黑素、6-苄氨基嘌呤和噻苯隆激素不同组合(Fow1~6 和 Ims1~6) 对其体细胞胚的诱导作用。【结果】马瑟兰花蕾在 Fow6 培养基上以及未成熟种子在 Ims2 和 Ims5 培养基上愈伤诱导率最高, 可达 67.19%~78.00%; 将其培养 12~14 周后的愈伤组织转移到 EM6 培养基上持续培养, 花蕾愈伤组织未能得到体细胞胚, 而来源于 Ims3 培养基的未成熟种子愈伤组织具有较高的体细胞胚发生率(6.77%), 并可在 EM6 培养基上正常成苗; SCM6 培养基有利于愈伤组织悬浮培养, 可获得大量增殖良好的非胚性细胞团, 细胞学观察结果表明愈伤细胞状态良好。【结论】以马瑟兰未成熟种子为外植体, 首次建立了其体细胞胚再生体系和愈伤组织悬浮培养体系, 对其遗传转化体系的建立、品质相关基因功能验证和分子育种等研究具有良好的支撑作用。

关键词: 葡萄; 马瑟兰; 体细胞胚发生; 植株再生; 愈伤悬浮

中图分类号: S663.103.2

文献标志码: A

文章编号: 1004-390X(2023)01-0112-10

Establishment of Somatic Embryogenesis System in *Vitis vinifera* L. cv. 'Marselan'

SHU Helin¹, CAO Huiling¹, SHAO Jianhui², YU Kunmiao¹, GUO Pan¹, MA Chunhua¹

(1. College of Landscape and Horticulture, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China;

2. Engineering Research Center of Grape and Wine of Yunnan Universities,

Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China)

Abstract: [Purpose] To establish somatic embryogenesis in *Vitis vinifera* L. cv. 'Marselan', and to provide new data for enhancing the theoretic basis for the establishment of genetic transformation system. [Methods] Flower buds and immature seeds of Marselan were used as explant, and the effects of different hormone combinations and hormone levels (Fow1-6 and Ims1-6) on the somatic embryogenesis were studied. The hormone of medium were supplemented with 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, melatonin, N-(phenylmethyl)-9H-purin-6-amine and thidiazuron. [Results] Flower buds from Marselan occurred the highest callus induction rate in Fow6 medium, and the immature seed from Marselan occurred the highest callus induction rate in Ims2 and Ims5 medium, with the callus induc-

收稿日期: 2022-04-04

修回日期: 2022-04-28

网络首发日期: 2023-03-14

*基金项目: 国家自然科学基金项目(32160691)。

作者简介: 舒河霖(1994—), 男, 四川南充人, 在读硕士研究生, 主要从事葡萄分子生物学研究。

E-mail: 15181739540@139.com

**通信作者 Corresponding author: 马春花(1979—), 女, 河南濮阳人, 博士, 副教授, 主要从事园艺植物资源评价和利用研究。E-mail: pony0207@126.com

网络首发地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/53.1044.S.20230313.1105.003.html>



tion rate from 67.19% to 78.00%. After 12 to 14 weeks of culture, the callus were transferred to the EM6 medium. Among them, the flower buds had no somatic embryos formation, but the immature seeds callus on the Ims3 medium were successfully induced somatic embryogenesis, and the induction rate was 6.77%, which could be formed normally on EM6 medium. SCM6 medium was beneficial to cell suspension cultures, and a large number of cell masses with good proliferation could be obtained. Cytological observation showed that callus cells were in good condition. [Conclusion] The somatic embryogenesis and the cell suspension cultures system of *V. vinifera* L. cv. 'Marselan' is firstly established, providing technical support for the establishment of genetic transformation system, the gene-verification and molecular breeding.

Keywords: grape; Marselan; somatic embryogenesis; plant regeneration; callus suspension

马瑟兰 (*Vitis vinifera* L. cv. 'Marselan') 属于欧亚种葡萄, 是法国国家农业科学研究院用葡萄品种赤霞珠 (Cabernet Sauvignon) 和歌海娜 (Grenache Noir) 杂交培育而成的中晚熟红色酿酒葡萄品种, 兼具歌海娜葡萄的耐热性和赤霞珠葡萄的细致感^[1], 2001年由法国引入中国, 并陆续在河北怀来、河北昌黎、山东蓬莱、北京延庆、甘肃天水 and 新疆焉耆盆地等进行试种栽培^[2]。除法国外, 中国是马瑟兰种植面积最广的国家, 种植面积约为 130~200 hm², 其良好的结实性和抗病性以及出众的果实品质、香气特征和酿酒特性使其成为极具潜力的品种^[3]。2020年, 中国葡萄总产量位居世界第2, 近年来葡萄生产逐渐由“总量增长型”向“质量效益型”转变^[4-5], 常规育种技术受限于葡萄育种周期长和遗传背景复杂, 很难满足生产需求。分子育种技术能定向改变育种目标, 并能减少生产实践中生长调节剂和病虫害农药残留对生态环境的影响^[6]; 同时, 快速发展的基因组学、蛋白质组学、代谢组学和生物信息学等技术为挖掘大量优良基因提供了可能。

具备良好的受体材料是实现遗传转化的重要基础。体细胞胚发生被认为是进行种质保存、脱病毒、植物繁殖和基因工程操作的优良途径^[7-8], 且研究表明处于旺盛分裂期的胚性愈伤组织、原胚团和体细胞胚有利于外源基因的整合, 提高转化效率及缩短转化周期^[9-10], 并对葡萄糖酸代谢、花色苷生物合成相关基因及抗性育种等研究具有重要意义^[11-12]。此外, 农杆菌介导愈伤组织的瞬时转化方法可以快速鉴定基因功能, 目前, 百合^[13]、杜鹃^[14]、茉莉花^[15]、板栗^[16]和苹果^[17]等诸多植物成功建立了愈伤瞬时转化体系, 而在葡萄上的研究较少。

葡萄体细胞胚诱导再生是外植体经过一系列脱分化与再分化, 类似合子胚再生完整植株的过程。与番茄、水稻、烟草和拟南芥等模式植物相比, 葡萄体细胞胚发生是受基因型、外植体、培养基和植物生长调节剂等多种因素交互影响的复杂过程。自 MULLINS 等^[18]首次利用赤霞珠葡萄未受精胚珠再生完整植株以来, 葡萄花药^[19]和子房^[20-21]被广泛用于体细胞胚发生。目前已有 6 个种、76 个品种的葡萄建立了体细胞胚发生的再生体系, 且以欧洲葡萄的整体诱导率偏高, 沙地葡萄、河岸葡萄和中国野生华东葡萄的诱导率则较低^[22]。霞多丽、赤霞珠、美乐和无核白是报道较多的葡萄品种^[23], 但依然存在发生不稳定和重复率低等问题; 而马瑟兰作为中国极具潜力的引进品种, 其体细胞胚再生体系至今未曾有成功报道。

早期, RAJASEKARAN 等^[24]研究认为只能从葡萄雄性植株中获得体细胞胚发生, 但随后的实验证实葡萄性别不是导致体细胞胚发生困难的重要遗传因素^[25]。后续研究中, 葡萄花蕾和未成熟种子因操作简便和体细胞胚发生率高而逐渐取代了花药与子房, 被用作体细胞胚发生的材料。DAI 等^[10]在对霞多丽进行体细胞胚诱导时发现花蕾优于花药和子房, 且有研究表明花药、子房和花蕾在胚性愈伤诱导中没有形态差异^[26]。此外, 一些新型的激素也用于研究葡萄体细胞胚发生。雅蓉等^[27]发现: 相较于 2,4-D, 褪黑素对无核白葡萄具有更好的诱导作用。尽管很多葡萄品种通过花蕾和未成熟种子成功建立了体细胞胚再生体系, 但其发生率每年都有所不同, 且胚性愈伤诱导与体细胞胚异常成苗是限制葡萄体细胞胚再生困难的主要因素^[28-29], 因此, 对于葡萄体细胞胚再生体系的研究仍需不断探索。

本研究以马瑟兰葡萄的花蕾及未成熟种子为外植体进行体细胞胚诱导并再生植株,探讨不同激素组合对其再生率的影响,以期为葡萄遗传转化体系的建立、功能基因验证和分子育种等提供良好的受体材料。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试酿酒葡萄品种马瑟兰种植于云南省昆明市寻甸回族彝族自治县云南农业大学寻甸大河桥葡萄种质资源圃(N25°57', E103°25'),以花蕾和未成熟种子作为外植体进行体细胞胚诱导。

试验所用 MS 和 B₅ 植物组织培养基、2,4-二氯苯氧乙酸 (2,4-dichlorophenoxyacetic acid, 2,4-D)、噻苯隆 (thidiazuron, TDZ)、6-苄氨基嘌呤 [N-(phenylmethyl)-9H-purin-6-amine, 6-BA]、吲哚丁酸 (indole-3-butyric acid, IBA)、酸水解酪蛋白和褪黑素均购自北京索莱宝科技有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 外植体采集与消毒

花蕾采集:按照支玉玺等^[30]的方法,于田间采集花前 7~10 d 的花序,此时大多数花蕾纵径约为 3 mm,横径约为 2 mm,花蕾顶端开始泛黄,其内花药呈淡黄色。

未成熟种子采集:根据 GRAY^[31]的研究,于田间采集花后 4 周的果穗,此时单果为黄豆大小,

纵径约为 1 cm,横径约为 5 mm,使用镊子和手术刀从果实中剥离未成熟种子,其纵径约为 4 mm,米粒大小。

所有的试验材料带回实验室,用洗洁精清洗 1 遍,再用流水冲洗 30 min,于 4 ℃ 低温存放 72 h。分离质地均匀、长势均一的单个花蕾和果实,于超净工作台内用 70% 酒精浸泡 30 s,无菌水冲洗 3 次;用 1% 有效氯含量的次氯酸钠振荡 15 min,无菌水清洗 3 次。将消毒完成的材料于 4 ℃ 低温放置 24 h,使用前重复上述步骤完成二次消毒。

1.2.2 愈伤组织诱导

在超净工作台内,将剥取的花蕾和未成熟种子接种于 B₅ 固体培养基 (30.0 g/L 蔗糖+2.0 g/L AC+1.5 g/L 植物凝胶+3.0 g/L 琼脂粉+500.0 mg/L 水解酪蛋白+100.0 mg/L 肌醇+0.5 g/L NaSiO₃·9H₂O) 中,添加不同质量浓度的植物激素 (2,4-D、褪黑素、TDZ 和 6-BA)(表 1),使用 1.0 mol/L HCl 调节 pH 至 5.8,121 ℃ 高压蒸汽灭菌 20 min; (25±1) ℃ 黑暗培养,每 4 周转移 1 次新鲜培养基并观察记录,直至诱导出愈伤组织,统计并计算愈伤组织诱导率。愈伤组织诱导率=出现愈伤的外植体数/外植体接种数×100%。

1.2.3 体细胞胚的萌发与成苗

改良程远等^[32]的 X6 培养基得到 EM6 培养基 (MS+60.0 g/L 蔗糖+0.5 g/L AC+1.5 g/L 植物凝

表 1 供试激素组合
Tab. 1 Hormone combinations for testing

培养基序号 medium codes	C _{2,4-D}	C _m	C _{TDZ}	C _{6-BA}
Fow1	0.6	—	1.8	—
Fow2	1.2	—	1.8	—
Fow3	2.4	—	1.8	—
Fow4	0.6	—	3.6	—
Fow5	1.2	—	3.6	—
Fow6	2.4	—	3.6	—
Ims1	2.0	—	—	1.5
Ims2	2.0	—	—	3.0
Ims3	2.0	—	—	4.5
Ims4	—	0.9	3.0	—
Ims5	—	0.9	5.0	—
Ims6	—	0.9	7.0	—

注: Fow和Ims分别表示外植体为花蕾和未成熟种子,下同; 2,4-D. 2,4-二氯苯氧乙酸, m. 褪黑素, TDZ. 噻苯隆, 6-BA. 6-苄氨基嘌呤。
Note: Fow and Ims indicate explant is flower and immature seed, respectively, the same as below; 2,4-D. 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, m. melatonin, TDZ. thidiazuron, 6-BA. N-(phenylmethyl)-9H-purin-6-amine.

胶+3.0 g/L 琼脂粉+3.0 g/L KNO_3 +0.2 g/L NH_4NO_3 +500.0 mg/L 水解酪蛋白+100.0 mg/L 肌醇+100.0 mg/L PVP+0.5 g/L $\text{NaSiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ +0.6 mg/L TDZ+0.1 mg/L 2,4-D)。将成功诱导的愈伤组织(约培养 12~14 周)接种于 EM6 培养基上, (25±1) °C 黑暗培养, 每 4 周更换 1 次新鲜培养基并观察记录, 体细胞胚形成后置于 (25±1) °C、2 000 lx 光照强度条件下光照 16 h/黑暗 8 h 交替培养直至其萌发成苗, 统计并计算体细胞胚诱导率。体细胞胚诱导率=出现体细胞胚数/外植体接种数×100%。

1.2.4 畸形苗的正常成苗

将畸形萌发的苗于超净工作台内剪成小段, 置于不含植物激素的 EM6 培养基上, 诱导正常茎叶系统生长, 并将其置于生根培养基 (1/2MS+15.0 g/L 蔗糖+7.0 g/L 琼脂+0.2 mg/L IBA) 上诱导根系生长, 观测记录生长状态, 统计并计算正常苗诱导率。正常苗诱导率=诱导出的正常苗数/接种的畸形茎段数×100%。

1.2.5 愈伤悬浮

选取马瑟兰花蕾和未成熟种子诱导产生的愈伤组织, 分别置于 SCM6 (MS+60.0 g/L 蔗糖+0.1 g/L AC+0.1 g/L 植物凝胶+3.0 g/L KNO_3 +0.2 g/L NH_4NO_3 +500.0 mg/L 水解酪蛋白+100.0 mg/L 肌醇+100.0 mg/L PVP+0.5 g/L $\text{NaSiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ +0.6 mg/L TDZ+0.1 mg/L 2,4-D) 和 SCD6 (C_2D +60.0 g/L 蔗糖+0.1 g/L AC+0.1 g/L 植物凝胶+3.0 g/L KNO_3 +0.2 g/L NH_4NO_3 +500.0 mg/L 水解酪蛋白+100.0 mg/L 肌醇+100.0 mg/L PVP+0.5 g/L $\text{NaSiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ +0.6 mg/L TDZ+0.1 mg/L 2,4-D) 悬浮培养基中, 在 24 °C 恒温摇床中以 130 r/min 黑暗培养 4 周, 每周更换 2/3 新鲜培养基。将培养后的悬浮细胞团用移液枪吸打到含有不同质量浓度 6-BA (0、0.5、1.0 和 2.0 mg/L) 的 MS 培养基中。所有培养基均添加 30.0 g/L 蔗糖、1.0 g/L AC 和 3.0 g/L 植物凝胶, 观察记录愈伤组织生长情况。

1.2.6 愈伤组织细胞学观察

参照程远等^[32]的方法, 使用改良苯酚品红溶液, 参照试剂使用说明书对培养的愈伤组织细胞进行染色制片, 并在光学显微镜下观察拍照。

1.3 数据统计和分析

所有试验均重复 3 次, 每次重复接种 60~70 个外植体。试验数据采用 Excel 2019 和 SPSS 22.0 软件进行统计分析, 多重比较采用 Duncan's

新复极差测验法 ($P<0.05$) 进行显著性分析。描述性统计值用“平均值±标准差”表示。

2 结果与分析

2.1 愈伤组织的诱导

接种 3 d 后花蕾 (图 1a) 萼片展开, 暴露出花丝、花药及子房 (图 1b), 3 周后子房明显膨大 (图 1c), 部分愈伤组织从花柄与花萼连接处、花丝与花药连接处及柱头产生 (图 1d)。主要形成 2 类质量不一的愈伤组织, 一部分为白色雪花状、透明水渍状的愈伤组织, 在后期的培养过程中溃散死亡; 另一部分为淡黄色、致密的愈伤组织, 继续培养能形成浅绿色细胞团, 且活力旺盛, 可以长期分裂成聚合状 (图 1e)。未成熟种子 (图 1f) 在诱导过程中部分失绿, 愈伤组织从远离喙部的膨大处产生, 也有一些从损伤部位长出棕色、疏松的愈伤组织, 持续培养发现部分愈伤呈白色透明或不透明状, 且生长迅速 (图 1g~j)。后期培养结果表明仅淡黄色或棕色的愈伤组织可以诱发体细胞胚产生。

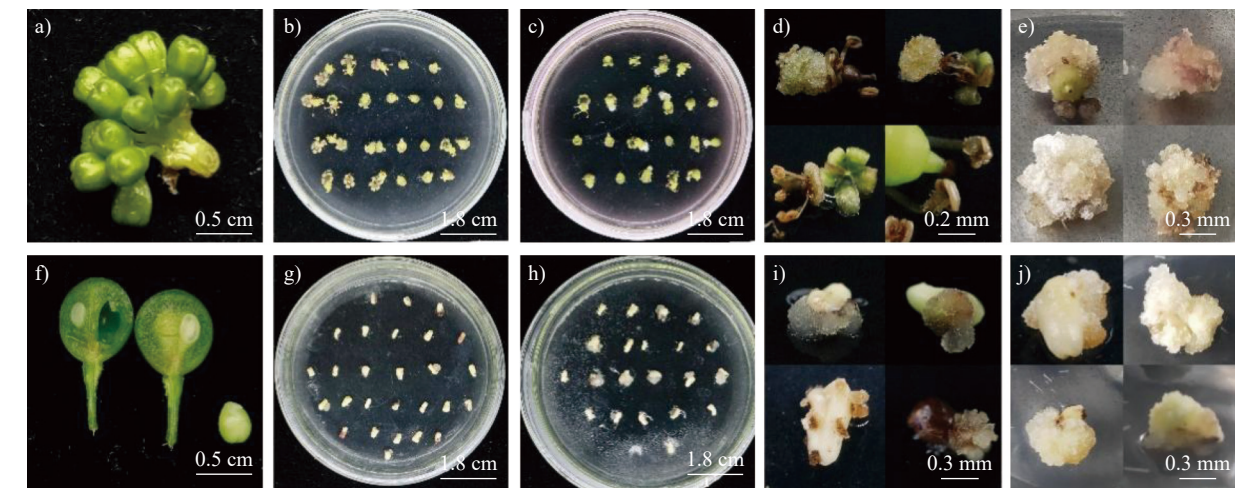
由表 2 可知: 所有的试验组合中, 花蕾外植体具有最高的愈伤诱导率, 在 Fow6 培养基上的诱导率可达 78%, 诱导作用显著高于处理花蕾外植体的其他培养基; 在 Ims2 和 Ims5 培养基上的诱导率分别为 67.19% 和 70.31%, 也显著高于其他培养基对未成熟种子的愈伤诱导作用。

2.2 体细胞胚的形成

马瑟兰花蕾相继诱导 20~30 周, 部分愈伤组织逐渐褐化死亡, 或是发育为水渍透明且无限增大的细胞团, 少部分增大为淡黄色松散、质地较脆的细胞团, 未能产生体细胞胚, 故未予统计。未成熟种子诱导愈伤组织 20 周后, 相继有少量的体细胞胚发生, 继续培养至 30 周, Ims2、Ims3、Ims5 和 Ims6 均能产生体细胞胚, 发生量依次为 2.08%、6.77%、3.65% 和 1.04%, 其中 Ims3 培养基的体细胞胚发生率显著高于其他培养基; 而 Ims1 和 Ims4 培养基未能产生体细胞胚, 愈伤组织部分褐化死亡, 部分扩增为深黄色的细胞团 (表 3)。

2.3 体细胞胚萌发与成苗

将未成熟种子诱导的体细胞胚接种于 EM6 培养基上, 进一步促进体细胞胚的萌发成苗。培养 4~8 周后, 观察到在胚性细胞团上具有乳白色



注: a) 花蕾; b)~c) 花蕾愈伤形成; d) 分别从花蕾花托、柱头、花丝与花托连接处、花丝与花药连接处产生的愈伤组织; e) 继续培养膨大的花蕾愈伤; f) 果实与未成熟种子; g)~h) 未成熟种子愈伤形成; i) 未成熟种子形成水渍状、淡黄色或棕色不透明愈伤组织; j) 未成熟种子愈伤进一步发育。

Note: a) flower buds; b)~c) callus formation of buds; d) callus from bud receptacle, stigma, filament-receptacle junction, filament-anther junction; e) continue to culture the enlarged bud callus; f) fruit and immature seeds; g)~h) callus formation of immature seeds; i) the immature seeds formed watery, light yellow or brown opaque callus; j) further development of callus from immature seeds.

图 1 马瑟兰葡萄花蕾及未成熟种子愈伤组织诱导

Fig. 1 Induction of callus from flower buds and immature seeds of grape Marselan

表 2 马瑟兰葡萄花蕾与未成熟种子在不同激素组合下的愈伤诱导效果

Tab. 2 Callus induction effects from flower buds and immature seeds of grape Marselan under different hormon combinations

培养基序号 medium codes	接种数 number of inoculation	愈伤组织诱导率/% callus induction rate	愈伤组织状态 callus status regulation
Fow1	200	4.00±0.81 e	花丝与花药连接处微量发生 trace occurrence at the junction of filament and anther
Fow2	200	14.00±2.76 e	花丝与花药连接处少量发生 occurs sparingly at the junction of filament and anther
Fow3	200	40.00±6.86 d	花柄切口处大量发生 a large number of flower stalk incisions occur
Fow4	200	4.00±0.81 e	花柄切口处微量发生 the incision of flower stalk occurred in trace
Fow5	200	12.00±3.12 e	花柄切口处发生 occurs at the notch of the flower stalk
Fow6	200	78.00±6.94 a	花柄切口处大量发生 a large number of flower stalk incisions occur
Ims1	192	52.08±2.39 bc	微小颗粒状愈伤 microscopic granular callus
Ims2	192	67.19±5.91 a	饱满淡黄色愈伤 full pale yellow callus
Ims3	192	48.44±2.70 bcd	微白色愈伤 bluish callus
Ims4	192	44.27±7.04 cd	大量发生, 干瘪, 不湿润 abundant, dry, not moist
Ims5	192	70.31±7.82 a	大量发生, 饱满湿润 abundant and moist
Ims6	192	56.77±2.39 b	大量发生, 微小湿润 occurring in large quantities and slightly moist

注: 各培养基配方见表1; 不同小写字母表示差异显著 ($P<0.05$); 下同。

Note: The media components of each medium list in Tab. 1; different lowercase letters indicate significant difference ($P<0.05$); the same as below.

的胚状物 (图 2a), 完整萌发的体细胞胚从淡黄色根、胚轴和未成熟的子叶 (图 2b~c)。体细胞胚继续生长, 胚轴伸长, 子叶展开呈微黄色, 正常光

和乳白色的愈伤组织中生长出来, 可见明显的胚

表 3 不同激素组合对马瑟兰葡萄未成熟种子体细胞胚的诱导作用

Tab. 3 Induction effects of different hormone combinations on the somatic embryos from immature seeds of grape Marselan

培养基序号 medium codes	体细胞胚诱导率/% induction rate of somatic embryos
Ims1	0 e
Ims2	2.08±0.90 c
Ims3	6.77±0.90 a
Ims4	0 e
Ims5	3.65±0.90 b
Ims6	1.04±0.90 cd

照培养后, 子叶逐渐变绿, 根系开始生长, 发育为完整植株 (图 2d~g)。在诱导过程中也出现很多畸形萌发, 表现为子叶融合, 胚轴伸长呈针形, 胚轴粗短, 子叶与根系衔接紧密, 胚轴褐化不长根; 体细胞胚发育为融合状植株, 真叶厚大致密, 在其上萌发的丛生芽真叶细长, 根系健壮, 但不能发育成完整的茎叶系统 (图 2g~j)。

将畸形萌发的茎叶剪成小段, 置于不含激素的 EM6 培养基上培养, 2~3 周后可见正常的茎叶从融合叶中生长出来, 继续培养 2~3 周后剥离完整的不定芽置于生根培养基上, 培养约 4 周后, 约有 21.74% 的畸形苗再次萌发, 并长出健壮的

根系, 植株发育正常 (图 3)。

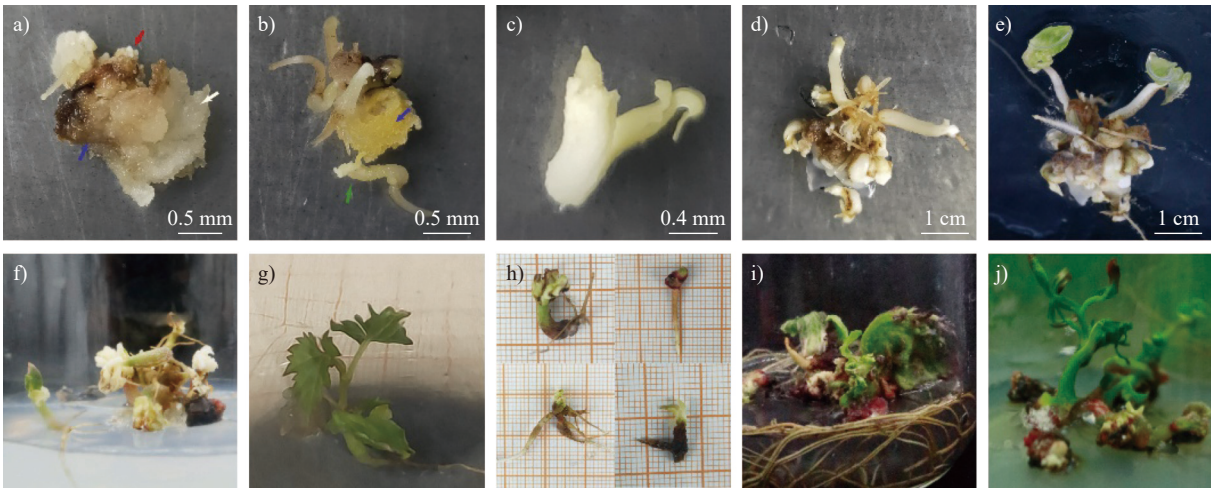
2.4 悬浮培养

马瑟兰花蕾与未成熟种子诱导的愈伤团置于 SCM6 和 SCD6 悬浮培养体系中, 结果显示: 其在 SCM6 培养基中细胞增殖良好, 细胞松散, 分布均匀 (图 4a); 而在 SCD6 培养基中细胞增殖缓慢, 偶有细胞聚合物出现, 持续培养中细胞团变成黑褐色, 影响进一步悬浮 (图 4b)。使用移液枪代替滤网, 将大小均匀的细胞培养物吸打到含不同质量浓度 6-BA 的 MS 培养基上, 经过 4~7 周的连续培养, 愈伤发育高度一致, 弱光培养一段时间后, 细胞团呈微红色, 有色素层积的细胞团; 有部分发育为颗粒状、颜色微绿或微黄的细胞团, 继续培养后增殖为深绿色的细胞团 (图 4c、f~h), 镜检结果发现其细胞分布均匀, 且大小一致, 具有排列规整的细胞壁 (图 4d), 持续培养过程中并未再次诱导出体细胞胚, 判定其为非胚性愈伤组织培养系。

3 讨论

3.1 外植体对葡萄体细胞胚发生的影响

外植体的选择是影响葡萄体细胞胚发生的重要因素。本研究采用马瑟兰葡萄的花蕾和未成熟

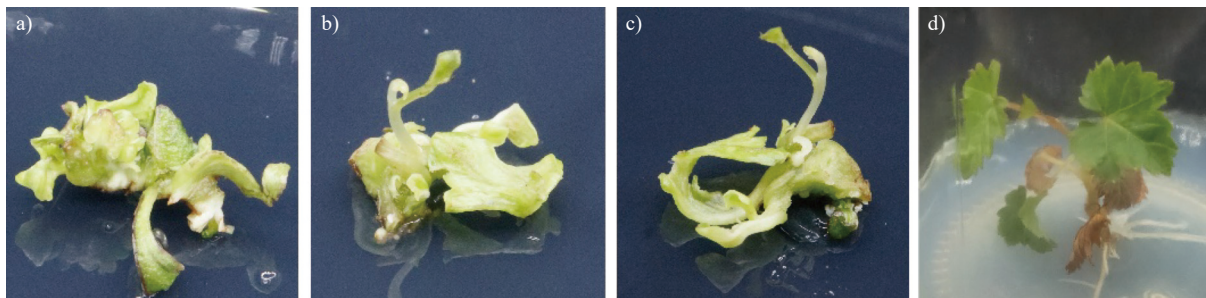


注: a) 胚性愈伤团, b) 萌发的体细胞胚, c) 完整体细胞胚, d)~g) 体细胞胚发育成苗, h) 异常萌发的体细胞胚, i)~j) 体细胞胚萌发畸形苗; 红色箭头表示未萌发的乳白色体细胞胚, 白色箭头表示白色不透明胚性愈伤组织, 蓝色箭头表示棕色或淡黄色胚性愈伤组织, 绿色箭头表示萌发的体细胞胚。

Note: a) embryogenic callus, b) embryonic somatic embryos, c) complete whole embryo, d)~g) somatic embryos develop into seedlings, h) abnormal germination of somatic embryos, i)~j) somatic embryo germination malformed seedlings; the red arrow represents milky white somatic embryos that did not germinate, the white arrow represents white opaque embryonic callus, the blue arrow represents brown or pale yellow embryonic callus, and the green arrow represents germinated somatic embryos.

图 2 马瑟兰未成熟种子体细胞胚诱导与萌发成苗

Fig. 2 Somatic embryo induction and germination of immature seeds of Marselan

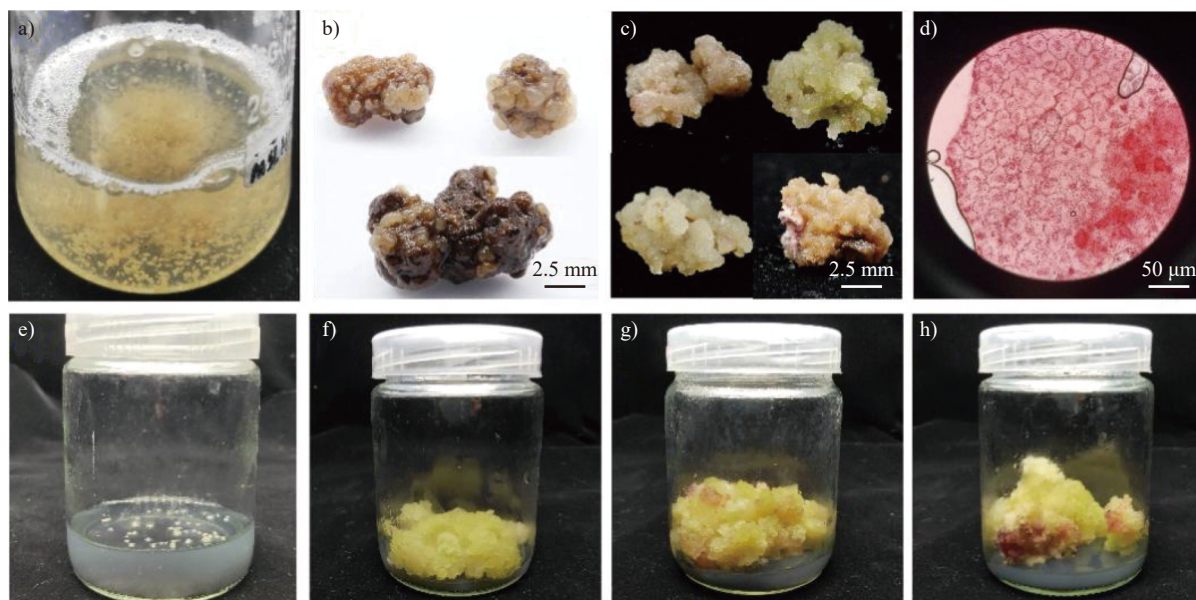


注: a) 切断的畸形苗叶片; b)~c) 叶段萌发不定苗; d) 不定苗生根。

Note: a) cut off malformed seedling leaves; b)~c) adventitious germination of leaf segments; d) rooting of adventitious seedlings.

图 3 畸形苗循环诱导

Fig. 3 Reculture of malformed seedlings



注: a) 愈伤悬浮培养; b) 不同形态的细胞聚合物; c) 培养过程中不同形态愈伤; d) 绿色疏松愈伤组织镜检; e)~h) 愈伤持续培养。

Note: a) callus suspension culture; b) aggregation of cells of different forms; c) callus with different morphology during culture; d) microscopic examination of green loose callus; e)~h) continuous callus culture.

图 4 愈伤悬浮培养

Fig. 4 Callus suspension culture

种子建立其体细胞胚发生体系, 结果表明: 花蕾作为外植体可以诱导大量的愈伤组织, 表现为白色疏松、水润透明、绿色致密和黄色松散等多种形态, 进一步培养发现花蕾并不能诱导胚性愈伤组织或体细胞胚发生; 而未成熟种子作为外植体, 可在 Ims2、Ims3、Ims5 和 Ims6 等培养基上诱导出体细胞胚, 但是愈伤组织诱导率整体低于花蕾。OLÁH 等^[19]早期研究发现: 11 个葡萄品种的花药具有较高的愈伤组织发生率, 但体细胞胚发生能力很低, 与本研究结果类似, 说明外植体愈伤组织发生能力与体细胞胚发生能力之间可能无直接关系。

已有研究认为葡萄花蕾具有较好的体细胞胚发生能力^[10, 26], 而本研究未能诱导成功, 这可能是由于葡萄不同的基因型所致, 马瑟兰花蕾并不是诱导体细胞胚发生的最佳材料。葡萄未成熟种子含幼嫩合子胚, 具备较强的细胞分裂能力。GRAY^[25]较早地使用圆叶葡萄未成熟的合子胚进行体细胞胚诱导, 结果表明: 花后 20 d 的子房进一步培养, 以剥离合子胚, 从而成功建立体细胞胚发生体系; 王华等^[33]采用欧洲葡萄美乐大小如绿豆的果实分离胚珠, 成功诱导体细胞胚发生; 对神索葡萄的研究^[34]也有类似的结果, 表明未成熟种子可能是诱导葡萄体细胞胚发生的优良材

料。本试验在前人研究的基础上,采用马瑟兰葡萄花后4周的果实分离未成熟种子进行培养,成功诱导出体细胞胚,并建立了马瑟兰葡萄的体细胞胚再生体系;而张莹等^[35]以霞多丽、马瑟兰和美乐等3个酿酒葡萄花后60~80 d的成熟种子为外植体,在MS培养基上进行次生胚诱导,结果并未诱导出马瑟兰葡萄的次生胚及体细胞胚发生,这可能与所使用的外植体状态及培养基类型有关。一般幼嫩的外植体具备更好的分裂能力和体细胞胚发生能力,且B₅培养基具有较高含量的钾盐和较低含量的氨态氮,适于葡萄科植物组织培养^[30];PERRIN等^[28]研究也表明:低含量的氨态氮能促进胚胎发生。这些研究结果为本研究成功建立马瑟兰未成熟种子体细胞胚再生体系提供了参考依据。

3.2 植物生长调节剂对葡萄体细胞胚发生的作用

6-BA和2,4-D是葡萄组织培养中最为常见和使用的植物生长调节剂^[23],培养基中添加的质量浓度和比例直接影响外植体的愈伤诱导和胚性形成,6-BA在葡萄体细胞胚诱导中尤为重要^[18],较低质量浓度的6-BA可以替代低温和赤霉素,促进体细胞胚正常成苗^[25]。TDZ也被认为是诱导葡萄体细胞胚发生的优良细胞分裂素,可以诱导葡萄成熟种子次生胚发生^[36]。本研究采用不同质量浓度的6-BA和TDZ对葡萄未成熟种子的体细胞胚发生进行诱导,发现较低质量浓度的6-BA(3.0 mg/L)有助于诱导未成熟种子的愈伤发生,而较高质量浓度的6-BA(4.5 mg/L)能更好地诱导其体细胞胚发生;使用TDZ的试验结果与之不同,较低质量浓度的TDZ(5.0 mg/L)也能诱导较多的体细胞胚发生,但6-BA的整体诱导效果优于TDZ,说明6-BA可能是建立马瑟兰葡萄未成熟种子体细胞胚发生的最佳细胞分裂素。杨晓明等^[34]在诱导神索葡萄体细胞胚时发现:只有添加较低质量浓度的2,4-D才能较好地诱导胚性愈伤组织发生;雅蓉等^[27]也发现:质量浓度较低的褪黑素有助于缩短诱导时限;本研究搭配较低质量浓度的2,4-D和褪黑素均诱导得到体细胞胚,表明较低质量浓度的生长素也有助于马瑟兰葡萄未成熟种子的体细胞胚诱导,且2,4-D的作用效果较好。

3.3 畸形苗萌发制约葡萄体细胞胚发生

葡萄胚性愈伤诱导、早熟胚和畸形萌发也是

限制体细胞胚发生的重要因素^[37],有报道表明:低温、6-BA和赤霉素处理可以促进体细胞胚正常发育与成苗^[24-25]。本研究在前期对外植体进行了一定的冷藏处理,也依旧存在畸形胚萌发的现象,主要表现为子叶融合,胚轴伸长呈针形,胚轴粗短,子叶与根系衔接紧密,胚轴褐化不长根;体细胞胚发育为融合状植株,真叶表现出厚大致密,在其上萌发的丛生芽真叶细长,根系健壮,但不能发育成完整的茎叶系统。这些现象与JI等^[29]在诱导无核白葡萄过程中发现的喇叭状、束状和融合的异常子叶现象类似。本研究经过循环诱导,将部分融合子叶胚切割处理后接种于不含植物激素的EM6培养基,可诱导产生正常的不定芽,并进一步在生根培养基上诱导根系生长,发育为完整植株,为马瑟兰葡萄体细胞胚萌发的畸形苗恢复为正常植株提供了可行的途径。

3.4 葡萄愈伤悬浮体系建立的作用与意义

再生体系与转化效率限制葡萄遗传转化与基因编辑研究进程^[38],虽然体细胞胚发生途径是进行分子育种的优良材料,但是在葡萄中诱导率低,研究进展缓慢;而农杆菌介导的瞬时转化技术能够快速鉴定基因功能,且愈伤组织材料更容易获取^[39],如金冠苹果愈伤组织瞬时过表达*MdACO1*基因可以促进乙烯合成^[17];刺葡萄*DFR*基因可以在茉莉花愈伤组织中过表达而改变花色苷积累^[15]。本研究成功建立了马瑟兰葡萄愈伤组织悬浮培养体系,使用SCM6培养基能够快速获得质地均匀的培养物,并可在不含6-BA的MS培养基上增殖;愈伤组织的镜检结果表明愈伤组织细胞有明显的细胞核和细胞壁,且细胞排列规整,与NAKANO等^[40]和程远等^[32]的研究结果类似。这为葡萄的瞬时转化和基因功能验证提供了良好的受体材料。

4 结论

本研究以马瑟兰葡萄的花蕾和未成熟种子为外植体,通过不同的激素组合处理,首次建立了马瑟兰体细胞胚再生体系,未成熟种子是建立该体系的优良材料。愈伤组织最佳诱导培养基为Ims5培养基,诱导率为70.31%;体细胞胚最佳诱导培养基为Ims3培养基,诱导率为6.77%,并可在EM6培养基上正常成苗;同时还建立了高

效的非胚性愈伤组织悬浮培养体系。本研究结果为葡萄遗传转化体系建立、功能基因验证和分子育种等研究奠定了良好的基础。

[参考文献]

- [1] 赵德升, 吴玉文, 段长青. 河北怀来地区马瑟兰葡萄果实品种香气组成分析[J]. 中外葡萄与葡萄酒, 2010, 35(9): 8. DOI: [10.13414/j.cnki.zwpp.2010.09.021](https://doi.org/10.13414/j.cnki.zwpp.2010.09.021).
- [2] 赵胜建, 郭紫娟, 马爱红, 等. 酿酒葡萄新品种“马瑟兰”引种栽培及酿酒特性简介[J]. 中外葡萄与葡萄酒, 2012, 37(3): 38. DOI: [10.13414/j.cnki.zwpp.2012.03.009](https://doi.org/10.13414/j.cnki.zwpp.2012.03.009).
- [3] 王舒伟, 马雪蕾, 马银凤, 等. ‘马瑟兰’葡萄在我国的栽培表现及研究进展[J]. 中外葡萄与葡萄酒, 2019, 44(3): 66. DOI: [10.13414/j.cnki.zwpp.2019.03.014](https://doi.org/10.13414/j.cnki.zwpp.2019.03.014).
- [4] 刘凤之, 王海波, 胡成志. 我国主要果树产业现状及“十四五”发展对策[J]. 中国果树, 2021, 63(1): 1. DOI: [10.16626/j.cnki.issn1000-8047.2021.01.001](https://doi.org/10.16626/j.cnki.issn1000-8047.2021.01.001).
- [5] 穆维松, 冯建英, 田东, 等. 我国鲜食葡萄产业的国际贸易与国内需求形势[J]. 中国果树, 2019, 61(2): 5. DOI: [10.16626/j.cnki.issn1000-8047.2019.02.002](https://doi.org/10.16626/j.cnki.issn1000-8047.2019.02.002).
- [6] RUGINI E, BASHIR M A, CRISTOFORI V, et al. A review of genetic improvement of main fruit trees through modern biotechnological tools and considerations of the cultivation and research of the engineered plant restrictions[J]. Pakistan Journal of Agricultural Sciences, 2020, 57(1): 17. DOI: [10.21162/PAKJAS/20.8361](https://doi.org/10.21162/PAKJAS/20.8361).
- [7] LI H, LI F L, DU J C, et al. Somatic embryogenesis and histological analysis from zygotic embryos in *Vitis vinifera* L. ‘Moldova’[J]. Forestry Studies in China, 2008, 10(4): 253. DOI: [10.1007/s11632-008-0040-8](https://doi.org/10.1007/s11632-008-0040-8).
- [8] CORREDOIRA E, VALLADARES S, VIEITEZ A M, et al. Improved germination of somatic embryos and plant recovery of european chestnut[J]. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, 2008, 44(4): 307. DOI: [10.1007/s11627-008-9105-6](https://doi.org/10.1007/s11627-008-9105-6).
- [9] DHEKNEY S A, LI Z T, DUTT M, et al. Agrobacterium-mediated transformation of embryogenic cultures and plant regeneration in *Vitis rotundifolia* Michx. (muscadine grape)[J]. Plant Cell Reports, 2008, 27(5): 865. DOI: [10.1007/s00299-008-0512-2](https://doi.org/10.1007/s00299-008-0512-2).
- [10] DAI L M, ZHOU Q, LI R M, et al. Establishment of a picloram-induced somatic embryogenesis system in *Vitis vinifera* cv. Chardonnay and genetic transformation of a stilbene synthase gene from wild-growing *Vitis* species[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2015, 121(2): 397. DOI: [10.1007/s11240-015-0711-9](https://doi.org/10.1007/s11240-015-0711-9).
- [11] GRAY D J, LI Z T, DHEKNEY S A. Precision breeding of grapevine (*Vitis vinifera* L.) for improved traits[J]. Plant Science, 2014, 228: 3. DOI: [10.1016/j.plantsci.2014.03.023](https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2014.03.023).
- [12] PRIETO H, MICCONO M, AGUIRRE C, et al. Grape biotechnology: past, present, and future[M]//CANTU D, WALKER M A. The grape genome. Cham: Springer International Publishing, 2019.
- [13] 权永辉, 刘雅莉, 祁银燕, 等. 百合愈伤组织的诱导及瞬时表达的研究[J]. 北方园艺, 2013, 37(16): 103.
- [14] 彭绿春, 周微, 汪玲敏, 等. 基于GUS基因瞬时表达优化云南杜鹃(*Rhododendron yunnanense* Franch.)遗传转化方法[J]. 云南农业大学学报(自然科学), 2016, 31(6): 1045. DOI: [10.16211/j.issn.1004-390X\(n\).2016.06.012](https://doi.org/10.16211/j.issn.1004-390X(n).2016.06.012).
- [15] 甘煌灿, 赖呈纯, 潘红, 等. 刺葡萄DFR基因植物表达载体构建及转化茉莉花愈伤组织的研究[J]. 热带作物学报, 2018, 39(6): 1128. DOI: [10.3969/j.issn.1000-2561.2018.06.014](https://doi.org/10.3969/j.issn.1000-2561.2018.06.014).
- [16] 于文杰, 楚天舒, 宋丽, 等. 板栗愈伤组织瞬时转化体系的优化与应用[J]. 西北植物学报, 2022, 42(1): 154. DOI: [10.7606/j.issn.1000-4025.2022.01.0154](https://doi.org/10.7606/j.issn.1000-4025.2022.01.0154).
- [17] 李兴亮, 丁宁, 贾美茹, 等. 苹果果实愈伤转化体系的建立及其在基因功能研究中的应用[J]. 中国农业大学学报, 2015, 20(2): 108. DOI: [10.11841/j.issn.1007-4333.2015.02.14](https://doi.org/10.11841/j.issn.1007-4333.2015.02.14).
- [18] MULLINS M G, SRINIVASAN C. Somatic embryos and plantlets from an ancient clone of the grapevine (cv. Cabernet-Sauvignon) by apomixis *in vitro*[J]. Journal of Experimental Botany, 1976, 27(5): 1022. DOI: [10.1093/jxb/27.5.1022](https://doi.org/10.1093/jxb/27.5.1022).
- [19] OLÁH R, ZOK A, PEDRYC A, et al. Somatic embryogenesis in a broad spectrum of grape genotypes[J]. Scientia Horticulturae, 2009, 120(1): 134. DOI: [10.1016/j.scienta.2008.10.003](https://doi.org/10.1016/j.scienta.2008.10.003).
- [20] KIKKERT J R, STRIEM M J, VIDAL J R, et al. Long-term study of somatic embryogenesis from anthers and ovaries of 12 grapevine (*Vitis* sp.) genotypes[J]. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, 2005, 41(3): 232. DOI: [10.2307/4293847](https://doi.org/10.2307/4293847).
- [21] VIDAL J R, RAMA J, TABOADA L, et al. Improved somatic embryogenesis of grapevine (*Vitis vinifera*) with focus on induction parameters and efficient plant regeneration[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2008, 96(1): 85. DOI: [10.1007/s11240-008-9464-z](https://doi.org/10.1007/s11240-008-9464-z).
- [22] 刘昱, 付濛濛, 安栋梁, 等. 葡萄体细胞胚发生及遗传转化体系研究进展[J]. 分子植物育种, 2018, 16(18): 6068. DOI: [10.13271/j.mpb.016.006068](https://doi.org/10.13271/j.mpb.016.006068).
- [23] ZHANG X M, WU Y F, LI Z, et al. Advancements in plant regeneration and genetic transformation of grapevine (*Vitis* Spp.)[J]. Journal of Integrative Agriculture, 2021, 20(6): 1407. DOI: [10.1016/S2095-3119\(20\)63586-9](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(20)63586-9).
- [24] RAJASEKARAN K, MULLINS M G. Embryos and plantlets from cultured anthers of hybrid grapevines[J]. Journal of Experimental Botany, 1979, 30(3): 399. DOI: [10.1093/jxb/30.3.399](https://doi.org/10.1093/jxb/30.3.399).
- [25] GRAY D J, MORTENSEN J A. Initiation and maintenance of long term somatic embryogenesis from anthers and ovaries of *Vitis longii* ‘Microsperma’[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1987, 9(1): 73. DOI: [10.1007/BF00046081](https://doi.org/10.1007/BF00046081).
- [26] GAMBINO G, RUFFA P, VALLANIA R, et al. Somatic embryogenesis from whole flowers, anthers and ovaries of grapevine (*Vitis* Spp.)[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2007, 90(1): 79. DOI: [10.1007/s11240-007-9256-x](https://doi.org/10.1007/s11240-007-9256-x).

- [27] 雅蓉,徐伟荣,张莹,等.褪黑素对‘无核白’葡萄体细胞胚的诱导作用[J].园艺学报,2020,47(5):953. DOI: 10.16420/j.issn.0513-353x.2019-0958.
- [28] PERRIN M, MARTIN D, JOLY D, et al. Medium-dependent response of grapevine somatic embryogenic cells[J]. Plant Science, 2001, 161(1): 107. DOI: 10.1016/S0168-9452(01)00385-5.
- [29] JI W, LUO Y X, GUO R R, et al. Abnormal somatic embryo reduction and recycling in grapevine regeneration[J]. Journal of Plant Growth Regulation, 2017, 36(4): 912. DOI: 10.1007/s00344-017-9694-6.
- [30] 支玉玺,张剑侠,王跃进.华东葡萄广西-2花药胚状体诱导与再生植株的研究[J].果树学报,2010,27(1):18. DOI: 10.13925/j.cnki.gsx.2010.01.006.
- [31] GRAY D J. Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature zygotic embryos of muscadine grape (*Vitis rotundifolia*) cultivars[J]. American Journal of Botany, 1992, 79(5): 542. DOI: 10.1002/j.1537-2197.1992.tb14590.x.
- [32] 程远,万东艳,张宝林,等.葡萄原胚团的诱导、保存、扩繁及其细胞学观察[J].果树学报,2017,34(8):968. DOI: 10.13925/j.cnki.gsx.20170011.
- [33] 王华,卢江,马春花,等.酿酒葡萄“梅尔诺”再生系统建立的研究[J].西北植物学报,2005,25(5):858. DOI: 10.3321/j.issn:1000-4025.2005.05.002.
- [34] 杨晓明,安黎哲,王雅梅,等.酿酒葡萄‘神索’体细胞胚发生及再生体系遗传稳定性分析[J].园艺学报,2006,33(6):1317. DOI: 10.16420/j.issn.0513-353x.2006.06.033.
- [35] 张莹,雅蓉,徐伟荣,等.褪黑素在霞多丽葡萄种子体细胞胚诱导发生中的作用[J].果树学报,2021,38(6):922. DOI: 10.13925/j.cnki.gsx.20210061.
- [36] PEIRÓ R, GAMMOUDI N, YUSTE A, et al. Mature seeds for *in vitro* sanitation of the grapevine leafroll associated virus (GLRaV-1 and GLRaV-3) from grape (*Vitis vinifera* L.)[J]. Spanish Journal of Agricultural Research, 2015, 13(2): e1005. DOI: 10.5424/sjar/2015132-7094.
- [37] PRADO M J, GRUEIRO M P, GONZÁLEZ M V, et al. Efficient plant regeneration through somatic embryogenesis from anthers and ovaries of six autochthonous grapevine cultivars from Galicia (Spain)[J]. Scientia Horticulturae, 2010, 125(3): 342. DOI: 10.1016/j.scienta.2010.04.019.
- [38] REUSTLE G M, BUCHHOLZ G. Recent trends in grapevine genetic engineering[M]//ROUBELAKIS-ANGE-LAKIS K A. Grapevine molecular physiology & biotechnology. Netherlands: Springer International Publishing, 2009.
- [39] ZHAO F L, LI Y J, HU Y, et al. A highly efficient grapevine mesophyll protoplast system for transient gene expression and the study of disease resistance proteins[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2015, 125(1): 43. DOI: 10.1007/s11240-015-0928-7.
- [40] NAKANO M, WATANABE Y, HOSHINO Y. Histological examination of callogenesis and adventitious embryogenesis in immature ovary culture of grapevine (*Vitis vinifera* L.)[J]. The Journal of Horticultural Science and Biotechnology, 2000, 75(2): 154. DOI: 10.1080/14620316.2000.11511215.

责任编辑:何承刚