

## 四个酿酒葡萄品种组培快繁体系的初建

刘娜, 许轲, 张文, 王琢, 朱元娣\*

中国农业大学农学与生物技术学院, 果树逆境生理与分子生物学北京市重点实验室, 北京100193

**摘要:** 为了提高酿酒葡萄(*Vitis vinifera*)苗木繁殖速度及苗木品质, 以‘赤霞珠’、‘西拉’、‘霞多丽’和‘美乐’4个品种为试材, 研究无菌外植体建立、启动培养、增殖培养和驯化移栽环节的关键技术, 初步建立酿酒葡萄组培快繁体系。结果表明, 以半木质化茎段为外植体接种成活率高, 在培养基MS+IBA 0.2 mg·L<sup>-1</sup>+6-BA 1.0 mg·L<sup>-1</sup>+KT 0.5 mg·L<sup>-1</sup>上启动培养外植体单芽萌发率最高, 以培养基1/2MS+IBA 0.2 mg·L<sup>-1</sup>+KT 1.0 mg·L<sup>-1</sup>增殖培养兼生根诱导, 组培苗生长健壮, 繁殖率高。增殖培养6代后, ‘赤霞珠’、‘西拉’、‘霞多丽’和‘美乐’分别由12株葡萄苗扩繁为1 383株、1 095株、744株和100株。组培苗驯化培养3周后移栽至营养钵, 4个品种成活率均在72%以上。此组培快繁体系基本适用于4个酿酒葡萄品种, 可应用于科学研究及工业化大规模生产。

**关键词:** 葡萄; 组织培养; 外植体; 苗木繁殖

## Preliminary Establishment of *in vitro* Rapid Micropropagation of Four Grape-Wine (*Vitis vinifera* L.) Cultivars

LIU Na, XU Ke, ZHANG Wen, WANG Zhuo, ZHU Yuan-Di\*

Beijing Key Laboratory of Stress Physiology and Molecular Biology for Fruit Trees, College of Agriculture and Biotechnology, China Agriculture University, Beijing 100193, China

**Abstract:** In order to speed up propagation and improve quality of grape-wine (*Vitis vinifera*) nursery plants, *in vitro* micropropagation was established. In the study, cultivars of ‘Cabernet Sauvignon’, ‘Syrah’, ‘Chardonnay’ and ‘Merlot’ were used as materials to explore key techniques of aseptic explant establishment, initial culture, shoot multiplication, acclimatization, and transplanting. The results showed that the most suitable medium for initial culture was MS medium supplementing with IBA 0.2 mg·L<sup>-1</sup>, 6-BA 1.0 mg·L<sup>-1</sup> and KT 0.5 mg·L<sup>-1</sup> when semi-lignified shoots were taken as explants. The 1/2MS medium supplementing with IBA 0.2 mg·L<sup>-1</sup> and KT 1.0 mg·L<sup>-1</sup> was suitable for inducing rooting, strengthening the vigor of plantlets and increasing proliferation rate of adventitious shoots. ‘Cabernet Sauvignon’, ‘Syrah’, ‘Chardonnay’ and ‘Merlot’ propagated 1 383, 1 095, 744 and 100 plantlets from initial twelve adventitious shoots after six generations of subculture, respectively. After three weeks of acclimatization, plantlets were transplanted to pots and the survival rate of four cultivars was above 72%. These results indicated that this *in vitro* rapid propagating system was basically suitable for four grape-wine cultivars and could be applied to scientific research and industrialized mass production.

**Key words:** *Vitis vinifera*; *in vitro* culture; explant; propagation of nursery plants

我国是全球最大的葡萄酒需求市场, 但酿酒葡萄仅占葡萄栽培总面积的18%, 中国葡萄酒产业面临进口葡萄酒的严峻挑战。酿酒葡萄品种的单一与苗木质量参差不齐成为限制我国葡萄酒产业发展的主要因素(刘世松2011a, b)。葡萄品种的苗木繁殖大多采用扦插和嫁接方法, 受母株及砧木的限制, 繁殖数量有限, 育苗周期长且易于传播病害(张发维等2011; 徐继成等2011; 姜燕琴等2009; García-González等2010; Diab等2011)。组培繁殖可利用较少的外植体, 在短期内快速繁殖优质苗

木而不受到季节的限制(Stamp等1990; Torregrosa和Bouquet 1996; Heloir等1997)。因此, 建立高效酿酒葡萄品种组培快繁体系, 可满足优质苗木商业化生产的需求, 也为酿酒葡萄品种的遗传转化体系建立, 提供了实验数据。

收稿 2013-08-01 修定 2013-08-29

资助 国家现代农业产业技术体系专项资金(CARS-30)和北京市教委项目(201307210610099)。

\* 通讯作者(E-mail: zhuyd@cau.edu.cn; Tel: 010-62733995)。

关于葡萄组织培养的报道集中在外植体接种、基础培养基的选择和外源生长物质配比等环节(Gray和Benton 1990, 1991; Jaskani等2008; Diab等2011)。外植体的接种是葡萄组织培养能否成功的关键。圆叶葡萄(*Vitis rotundifolia*)品种以10 cm长的新梢为外植体, 接种成活率高(94%)、污染率少(3%) (Gray和Benton 1990, 1991)。*‘Perlette’*和*‘Sperryo’*两个酿酒葡萄品种以茎尖为外植体, 接种易于成活、污染率低(<10%) (Jaskani等2008; Diab等2011)。基本培养基显著影响葡萄启动培养和增殖培养(Gray和Benton 1990, 1991)。圆叶葡萄品种在MS、1/2MS和C<sub>2</sub>D (chee and pool *vitis* medium) (Chee和Pool 1982)培养基上, 茎段扩繁率高、组培苗生长健壮(Gray和Benton 1990, 1991)。C<sub>2</sub>D是MS的衍生物, 无机营养成分中各离子浓度与MS相差不大, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>浓度相对较高(Chee和Pool 1982)。*‘Perlette’*在MS培养基上茎段扩繁率最高, 而*‘Sperryo’*在C<sub>2</sub>D培养基上组培苗繁殖速度最快, 生长健壮。WPM (woody plant medium)适宜多种木本植物的组织培养, 但多个葡萄品种在WPM培养基上表现出严重的玻璃化现象(Gray和Benton 1990, 1991; Jaskani等2008; Diab等2011)。NLN (nistch and nitsch medium)在葡萄组培中的研究未有报道。外源生长物质的种类和配比影响不同葡萄品种的增殖和生根(Jaskani等2008; Diab等2011)。*‘Perlette’*、*‘Sperryo’*和圆叶葡萄品种在不添加任何生长素、仅加入6-BA (6-benzylamino purine, 6-苄氨基腺嘌呤) 1 mg·L<sup>-1</sup>的MS培养基中, 茎扩繁效率高, 植株生长良好(Gray和Benton 1990, 1991; Jaskani等2008; Diab等2011)。细胞分裂素类物质TDZ (thidiazuron, 苯基噻二唑基脲)使葡萄组培苗易于玻璃化、生长发育不良(Gray和Benton 1990, 1991; Jaskani等2008)。KT (kinetin, 6-糠氨基嘌呤)对圆叶葡萄组培苗的茎段增殖没有作用(Gray和Benton 1990, 1991)。生长素类物质是葡萄组培苗生根培养的必要物质, 以IBA (3-indolebutyric acid, 3-吲哚丁酸)浓度为1~2 mg·L<sup>-1</sup>, 生根诱导率高(80%) (Jaskani等2008)。NAA (1-naphthylacetic acid, 萘乙酸)不适合*‘Sperryo’*葡萄的组培苗生根培养(Diab等2011)。

目前, 有关酿酒葡萄品种的组培繁殖报道少, 适合不同酿酒葡萄品种的组培快繁体系不完善,

不利于将组培快繁技术转化为酿酒葡萄品种苗木繁殖的商业化生产。本研究以四个酿酒葡萄品种*‘赤霞珠’*、*‘霞多丽’*、*‘西拉’*和*‘美乐’*为试材, 拟通过探索无菌外植体接种、启动培养、增殖培养和驯化移栽环节的关键技术, 初步建立酿酒葡萄组培快繁体系, 为酿酒葡萄新品种的规模化生产提供依据。

## 材料与方法

### 1 试验材料

田间生长的*‘赤霞珠’*、*‘霞多丽’*、*‘西拉’*和*‘美乐’* 4个品种酿酒葡萄(*Vitis vinifera* L.)植株。

### 2 试验方法

#### 2.1 外植体消毒及启动培养

选取旺盛生长的葡萄新蔓, 分别剪取幼嫩的梢端、木质化和半木质化的茎段为外植体, 用加入洗涤灵的水充分清洗后, 超净台内进行表面消毒。消毒过程为: 70%酒精消毒30 s、无菌水冲洗1~2次、5%次氯酸钠消毒5 min、再用无菌水冲洗4~5遍, 最后用灭菌的滤纸吸去茎段表面的多余水分, 分别接种于MS、NLN和WPM这3种不同的培养基上, 于光照条件(光强为30~40 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>, 光照时间为14 h·d<sup>-1</sup>)下培养, 组培室温度为(25±2) °C。培养基中均加入IBA 0.2 mg·L<sup>-1</sup>+6-BA 1.0 mg·L<sup>-1</sup>+KT 0.5 mg·L<sup>-1</sup>+蔗糖30 g·L<sup>-1</sup>+琼脂6.5 g·L<sup>-1</sup>。取出在MS培养基中培养的4个品种的半木质化茎段各20个置于黑暗条件下培养。14 d后统计茎段生长状况和萌芽率。

#### 2.2 增殖培养

外植体接种20~25 d后, 单芽萌发生长至长度为5~6 cm时, 继代培养。剪切萌发的新梢, 去除大叶片后剪成单芽茎段(长5~15 mm), 每瓶接种3~5个茎段。选用以下3种处理作为增殖培养基: T1: 1/2MS+IBA 0.2 mg·L<sup>-1</sup>+KT 1.0 mg·L<sup>-1</sup>; T2: MS+6-BA 0.5 mg·L<sup>-1</sup>+KT 0.5 mg·L<sup>-1</sup>+IBA 0.2 mg·L<sup>-1</sup>; T3: 1/2MS+IBA 0.2 mg·L<sup>-1</sup>+6-BA 0.5 mg·L<sup>-1</sup>。3种培养基均加入蔗糖30 g·L<sup>-1</sup>和琼脂6.5 g·L<sup>-1</sup> (pH 5.8)。筛选适宜的葡萄增殖培养基。

每个葡萄品种选择经过启动培养萌发的新芽12个, 接种在适宜的增殖培养基上, 记为第一代。每50 d继代一次, 记录每次继代培养各葡萄品种组

育苗的数量。

组培材料置放于温度为 $(25\pm 2)$  °C, 光强为 $30\sim 40 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , 光照时间为 $14 \text{h}\cdot\text{d}^{-1}$ 的培养室中培养。

### 2.3 生根培养

选用增殖培养过程中生长健壮的组培苗, 剪切长度在 $2.5\sim 3.0 \text{cm}$ 并含有顶端生长点的新梢, 接种在新的培养基( $1/2\text{MS}+\text{IBA } 0.2 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}+\text{KT } 1.0 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}+\text{蔗糖 } 30 \text{g}\cdot\text{L}^{-1}+\text{琼脂 } 6.5 \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  (pH 5.8)中, 进行壮苗和生根培养。

### 2.4 驯化移栽

将组培苗从组培室移至有自然光照的室温条件下, 置放于散射光下炼苗 $5\sim 7 \text{d}$ 后, 移至直射光照射的地方继续炼苗 $5\sim 7 \text{d}$ 。待组培苗的叶片颜色变浓绿、富有光泽时即揭开封口膜, 继续炼苗 $3\sim 5 \text{d}$ , 及时喷水防止叶片萎蔫。

温室内配制营养土, 按有机质:蛭石:园土=1:1:1 ( $V/V/V$ )比例混合, 装入小营养钵中(直径 $6.5 \text{cm}$ )。把组培苗从三角瓶中取出, 去除根部的培养基, 水中清洗干净, 并移栽至营养钵中。搭建简易塑料小拱棚, 保温( $25 \text{°C}\pm 2 \text{°C}$ )保湿(空气相对湿度100%), 及时浇水以保证土壤湿度, 适时通风换气。移栽后第4周即可去掉覆盖物。组培苗移栽成活后, 需注意控水, 防止烂根或根颈部腐烂。

## 实验结果

### 1 四个酿酒葡萄品种在3种培养基上启动培养生长情况

选取四个酿酒葡萄品种的幼嫩的梢端、木质化和半木质化茎段为外植体接种, 以半木质化茎段接种成活率最高(90%)。幼嫩新梢的外植体接种后大部分褐化死亡, 接种成活率次之(24%)。木质化的外植体接种后污染严重, 接种成活率最低(5%)。

在MS、NLN和WPM三种培养基上, ‘赤霞珠’的接种萌芽率分别为100%、100%和63.3%, ‘霞多丽’的萌芽率分别为73.3%、63.3%和60%, ‘西拉’接种萌芽率分别为86.7%、76.7%和73.3%, ‘美乐’接种萌芽率分别为83.3%、80%和56.7%。

四个酿酒葡萄品种在3种培养基中均可以启动培养, 以MS为基本培养基的葡萄外植体萌芽率

最高, 4个品种的接种培养萌芽率均在73%以上; 其次是NLN培养基, WPM培养基接种萌芽率最低。

### 2 光照对葡萄茎段启动培养的影响

将接种在MS培养基中的4个品种的半木质化茎段, 分别置放在光照和黑暗中培养。‘赤霞珠’接种萌芽率分别为87.8% (光照培养)和67.7% (暗培养)、‘霞多丽’分别为65.6%和42.2%、‘西拉’分别为78.9%和26.2%、‘美乐’分别为73.3%和73.8%。四个品种启动培养时, 外植体在光照和黑暗培养条件下均可萌发生长。但光照比暗培养更利于外植体生长(图1)。光照条件下, 外植体生长健壮, 叶片浓绿、富有光泽。暗培养条件下, 外植体成活率低, 叶片黄化。

### 3 四个酿酒葡萄品种继代培养扩繁情况

四个葡萄品种分别在T1 ( $1/2\text{MS}+\text{IBA } 0.2 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}+\text{KT } 1.0 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )、T2 ( $\text{MS}+6\text{-BA } 0.5 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}+\text{KT } 0.5 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}+\text{IBA } 0.2 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )和T3 ( $1/2\text{MS}+\text{IBA } 0.2 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}+6\text{-BA } 0.5 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )培养基上继代培养。T1培养基的组培苗生长健壮, 培养1个月后生根, 每50 d剪切单芽茎段继代培养一次。如表1所示, 继代培养6代后4个品种增殖数量不同, 以‘赤霞珠’和‘西拉’繁殖速度最快。T2培养基中茎段的不定芽分化数量多, 但生长瘦弱矮小, 没有不定根发生。继代培养后易发生组培苗玻璃化现象, 影响后续生根诱导培养。T3培养基中茎段生长缓慢, 每培养60 d可继代一次, 继代间隔周期长, 影响组培苗繁殖速度。

T1培养基在促进葡萄茎段生长的同时, 可以生根壮苗, 组培苗繁殖的数量与质量优于T2和T3培养基。3个葡萄品种在T1培养基上继代生长情况如图2所示。

### 4 四个酿酒葡萄品种的生根生长及驯化移栽

选取生长健壮的新梢(含生长点)接种在T1培养基上进行生根培养。40 d后统计组培苗的株高和节数、根系数量和根长。四个品种组培苗生长势差异显著(表2), ‘赤霞珠’和‘霞多丽’生长势优于‘西拉’和‘美乐’。

组培苗炼苗3周后移栽至营养钵, 4周后统计移栽成活率。4个品种的成活率分别是‘赤霞珠’88%、‘西拉’80%、‘霞多丽’72%和‘美乐’70%。生长健壮的组培苗(3节以上茎长), 经过适宜的驯



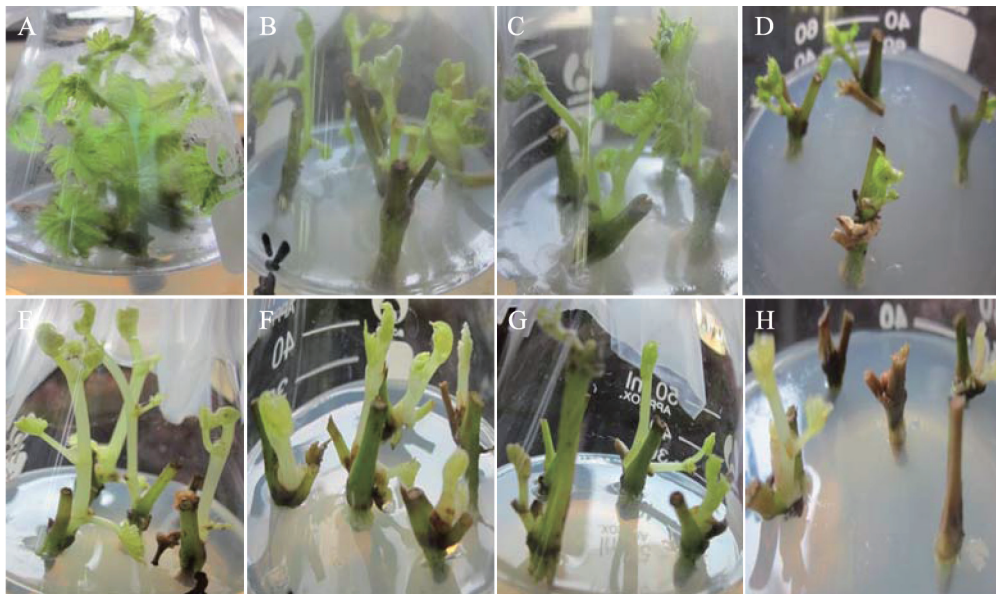


图1 四个葡萄品种在MS培养基上光暗培养14 d后长势对比

Fig.1 Growth status of plantlets of four grape-wine cultivars on MS medium under light and dark for two weeks

A: 光培养‘赤霞珠’; B: 光培养‘美乐’; C: 光培养‘西拉’; D: 光培养‘霞多丽’; E: 暗培养‘赤霞珠’; F: 暗培养‘美乐’; G: 暗培养‘西拉’; H: 暗培养‘霞多丽’。

表1 四个葡萄品种在T1培养基上的继代培养

Table 1 Subculture of plantlets of four grape-wine cultivars on T1 medium

品种	组培苗数量/个					
	第1代	第2代	第3代	第4代	第5代	第6代
‘赤霞珠’	12	41	149	362	682	1 383
‘西拉’	12	22	65	150	560	1 095
‘霞多丽’	12	21	63	93	256	744
‘美乐’	12	14	17	28	43	100

化和移栽后,控制在合适的温湿度下,移栽成活率高。四个葡萄品种驯化移栽后幼苗的生长情况如图3所示。

## 讨 论

葡萄组培过程包括外植体接种、继代增殖培养、生根诱导和驯化移栽4个环节,外植体接种和驯化移栽是两个关键的环节,决定了葡萄组培繁殖能否成功(Chuong和Beverdors 1985)。本研究通过选用葡萄新梢不同部位(幼嫩的梢端、木质化和半木质化的茎段)为外植体,进行消毒接种,发现以葡萄新梢的半木质化茎段作为外植体材料,接种培养污染率低,外植体萌芽率高,是葡萄组培的理想外植体。表面消毒剂选用70%酒精搭配5%次

氯酸钠,以减免使用升汞对环境造成的危害(孙冬青等2008)。在驯化移栽过程中,选用生长健壮、生根良好的组培苗,辅以适当的驯化炼苗和移栽阶段的温湿度控制,使组培苗的移栽成活率达70%以上。

启动培养和继代增殖培养是葡萄组培苗快速繁殖的关键阶段。4个葡萄酿酒品种在MS、NLN、WPM三种培养基均能启动培养,以MS培养基中茎段萌芽率最高。NLN与WPM培养基中大量元素离子浓度很低,影响葡萄组培苗的生长发育。本研究以添加IBA 0.2 mg·L<sup>-1</sup>和KT 1.0 mg·L<sup>-1</sup>的1/2MS培养基为葡萄的继代增殖和生根培养基,既可扩繁殖又可生根壮苗。组培苗的新梢生长健壮,根系发达,驯化移栽成活率高。添加6-BA

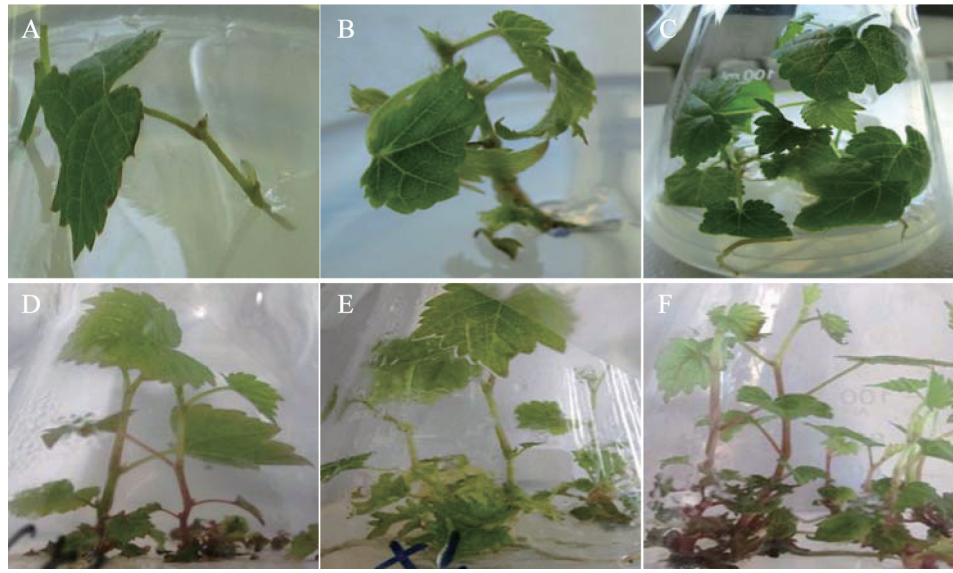


图2 三个葡萄品种在T1培养基上继代长势对比

Fig.2 Growth status of plantlets of three grape-wine cultivars on T1 medium

A: '赤霞珠'培养1 d; B: '赤霞珠'培养21 d; C: '赤霞珠'培养40 d; D: '赤霞珠'3代后继代30 d; E: '西拉'3代后继代30 d; F: '霞多丽'3代后继代30 d。

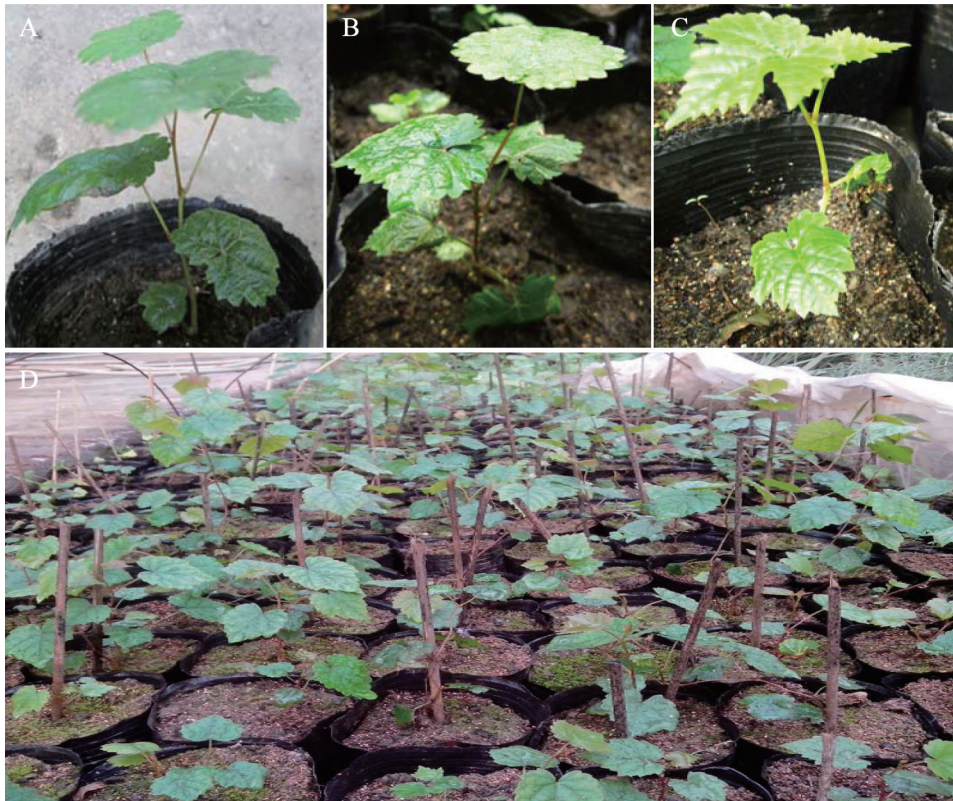


图3 四个葡萄品种的移栽

Fig.3 Transplantation of plantlets of four grape-wine cultivars

A~D分别为'西拉'、'霞多丽'、'美乐'和'赤霞珠'组培苗移栽30 d的生长情况。



表2 四个葡萄品种驯化前的生长状况

Table 2 Growth status of plantlets of four grape-wine cultivars before acclimatization

品种	平均株高/cm	平均节数/节	平均根数/条	平均根长/cm
‘赤霞珠’	6.24±1.78 <sup>a</sup>	4.4±1.43 <sup>a</sup>	3.5±1.43 <sup>a</sup>	6.92±1.47 <sup>a</sup>
‘霞多丽’	5.39±1.25 <sup>ab</sup>	4.7±0.67 <sup>a</sup>	4.9±1.97 <sup>a</sup>	4.93±2.04 <sup>b</sup>
‘西拉’	4.37±1.25 <sup>b</sup>	3.8±0.79 <sup>a</sup>	2.3±1.42 <sup>b</sup>	3.51±1.18 <sup>b</sup>
‘美乐’	5.33±1.51 <sup>ab</sup>	4.3±1.06 <sup>a</sup>	3.6±1.91 <sup>a</sup>	5.12±2.10 <sup>b</sup>

表中数字为平均数±标准差, 同列数字旁不同小写字母表示在0.05水平下有显著性差异。

0.5 mg·L<sup>-1</sup>、KT 0.5 mg·L<sup>-1</sup>和IBA 0.2 mg·L<sup>-1</sup>的MS培养基中, 组培苗不定芽发生数量多, 但生长弱, 不易诱导生根, 可能与培养基中盐离子浓度高与外源激素类物质配比不适宜有关(周恒等2010; 李永辉等2007)。KT有利于4个酿酒葡萄品种的组培苗生长, 但6-BA效果不理想, 这与前人的研究结果不甚符合(Gray和Benton 1990, 1991; Jaskani等2008; Diab等2011), 可能与6-BA浓度、激素类物质配比和品种基因型差异有关。

本研究以4个酿酒品种‘赤霞珠’、‘霞多丽’、‘西拉’和‘美乐’半木质化茎段为外植体, 接种成活率高。启动培养以MS基本培养基中的茎段萌芽率高。添加IBA 0.2 mg·L<sup>-1</sup>和KT 1.0 mg·L<sup>-1</sup>的1/2MS培养基可以用于茎段增殖培养和生根壮苗。生长健壮的组培苗炼苗3周后移栽, 辅以适宜的温湿度控制, 组培苗的移栽成活率较高。酿酒葡萄品种组培快繁体系的初步建立, 为酿酒葡萄品种苗木繁殖的商业化生产提供依据。

### 参考文献

- 姜燕琴, 於虹, 陈静波(2009). 不同基本培养基对南高丛越橘优选系增殖的影响. 吉林农业大学学报, 31 (5): 532~537
- 李永辉, 白远国, 邓红云, 陈豪(2007). 不同浓度6-BA对“红标无核”葡萄茎段培养的影响. 安徽农业科学, 35 (15): 4452~4453

- 刘世松(2011a). 中国葡萄酒产业面临的危机与对策. 酿酒, 38 (5): 80~83
- 刘世松(2011b). 进口葡萄酒对我国葡萄酒产业的影响及对策. 中国市场, (45): 157~163
- 孙冬青, 王飞, 李新风(2008). 组培微环境对葡萄风信子组培苗生长及移栽后生理特性的影响. 西北农业学报, 17 (4): 244~248, 262
- 徐继成, 霍生, 刘辉(2011). 葡萄苗木繁殖实用技术. 吉林农业, (1): 64
- 张发维, 罗会贤, 李晓松, 黎明(2011). 优质果苗的繁殖技术总结. 中国园艺文摘, 27 (10): 152~155
- 周恒, 万召娣, 罗静(2010). 紫秋刺葡萄离体繁殖研究初报. 贵州农业科学, 38 (9): 22~25
- Chee R, Pool RM (1982). The effects of growth substances and photoperiod on the development of shoot apices of *Vitis* cultured *in vitro*. *Sci Hort*, 16: 17~27
- Chuong PV, Beversdorf WD (1985). High frequency embryogenesis through isolated microspore culture in *Brassica napus* L. and *B. carinata* braun. *Plant Sci*, 39 (3): 219~226
- Diab AA, Khalil SM, Ismail RM (2011). Regeneration and micropropagation of grapevine (*Vitis vinifera* L.) through shoot tips and axillary buds. *IJABR*, 2 (4): 484~491
- García-González R, Quiroz K, Carrasco B, Caligari P (2010). Plant tissue culture: current status, opportunities and challenges. *Cienc Inv Agr*, 37 (3): 5~30
- Gray DJ, Benton CM (1990). Micropropagation and plant establishment of muscadine grape. *Proc Fla State Hort Soc*, 103: 300~302
- Gray DJ, Benton CM (1991). *In vitro* micropropagation and plant establishment of muscadine grape cultivars (*Vitis rotundifolia*). *Plant Cell Tiss Org Cult*, 27: 7~14
- Heloir MC, Fournioux JC, Oziol L, Bessis R (1997). An improved procedure for the propagation *in vitro* of grapevine (*Vitis vinifera* cv. Pinot noir) using axillary-bud microcuttings. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 49: 223~225
- Jaskani MJ, Abbas H, Sultana R, Khan MM, Qasim M, Khan IA (2008). Effect of growth hormones on micropropagation of *Vitis vinifera* L. cv. Perlette. *Pak J Bot*, 40 (1): 105~109
- Stamp JA, Colby SM, Meredith CP (1990). Direct shoot organogenesis and plant regeneration from leaves of grape (*Vitis* spp.). *Plant Cell Tiss Org Cult*, 22: 127~133
- Torregrosa L, Bouquet A (1996). Adventitious bud formation and shoot development from *in vitro* leaves of *Vitis*×*Muscadinia* hybrids. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 45: 245~252