

山葡萄组培中激素配比模式研究初报¹⁾

高金辉¹, 张厚良¹, 王 龄¹, 赵学民²

(1. 伊春林业科学院, 黑龙江 伊春 153000; 2. 伊春友好林业局)

摘 要: 选择幼嫩的茎尖作为外植体, 最优的灭菌时间为 9min, 能直接建立快速再生体系。结果表明: 最优诱导培养基: MS+6-BA 0.5mg/L+KT 0.5mg/L+NAA 0.2mg/L; 增殖培养基: MS+6-BA 2.0mg/L+KT 2.0mg/L+NAA 0.05mg/L; 生根培养基: MS+IBA 0.05mg/L。

关键词: 山葡萄; 组织培养; 激素配比

Preliminary study report of hormone treatment models in the tissue culture process of *Vitis amurensis*

Gao Jinhui¹, Zhang Houliang¹, Wang Ling¹, Zhao Xuemin²

(1. Academy of YiChun Forest Science, Yichun, Heilongjiang, 153000;

2. YouHao forest bureau, Yichun, Heilongjiang)

Abstract: Plant regeneration system of *Vitis amurensis* Rupr. Was established with stem section. Nine minutes was the best sterilization time. Results showed that the optimum cluture medium for bud differentiation was MS+6-BA 0.5mg/L+KT 0.5mg/L+NAA 0.2mg/L; the subcluture medium was MS+6-BA 2.0mg/L+KT 2.0mg/L+NAA 0.05mg/L; the rooting medium was MS+IBA 0.05mg/L.

Key word: *Vitis amurensis* Rupr.; Tissue Cluture; Hormone Formulation

山葡萄(*Vitis amurensis* Rupr.)又名野葡萄, 是葡萄科葡萄属的落叶藤本植物。它耐寒, 抗病性强, 果实产量高, 营养丰富, 除了含有糖、有机酸外, 还含有蛋白质及钾、钙、磷、铁等多种矿物质和人体必需的氨基酸等营养成分; 酸甜适度, 色泽红艳, 是生产山葡萄酒的优质原料, 同时也是生产染色剂和天然色素的重要原料^[1]。

随着山葡萄精深加工业的迅速发展, 市场对野生山葡萄的需求量大幅增加, 导致其果实价格逐年攀升; 野生山葡萄遭到严重破坏, 资源逐年减少, 加之野生山葡萄自然更新能力较弱, 扦插苗木易受病毒侵袭, 品质性状也明显下降; 随着林权制度改革的实施, 有了自己林地的职工对种植经济植物的需求在不断增加, 经济效益好的项目成为林区人民的首选, 也将成为人民致富和林区经济发展的新亮点。所以, 利用组培技术快速繁育山葡萄苗木, 不仅能够改造原有野生日趋退化的山葡萄品种, 丰富当地的物种资源, 还能促进经济快速、健康、持续发展, 保持社会稳定。

1 试材来源及生长地自然条件

试验材料来自伊春林科院实验站内 1991 年扦插的南岔种源中优良植株。植株结实量大, 果实味道纯

正, 各种生长性状均表现优良。实验站地处 N47°44', E128°55', 属于北温带半湿润的森林气候, 土壤为典型暗棕壤, 有效土层厚度 ≥ 50cm, pH 值 5.8。年平均气温 1℃, ≥ 10℃ 的有效积温 2190℃, 无霜期约 114d。年降水量为 590~660mm, 海拔 250m, 光照丰富, 年日照时为 2350~2550h。太阳辐射总量为 460.24 kJ/cm², 年光合有效辐射 20 920 kJ/cm²^[2]。

2 试验研究方法

2.1 外植体采集及表面灭菌

幼嫩的外植体采于 5~6 月份的晴朗中午, 将嫩枝(茎尖)带回实验室, 在室内作表面灭菌处理。硬枝采于冬季 12 月份至翌年 1 月份, 采回的材料在温度为 20℃ 实验室内水培, 每 3d 换 1 次水, 待硬枝上长出的嫩芽高达 3.0~7.0cm 时取下, 先用洗洁精溶液浸泡 1min, 再用自来水冲净洗洁精, 将材料放在超净工作台上。先用浓度为 75% 的酒精预处理 30s, 然后用无菌水冲洗 2 次; 再用质量分数为 0.1% 的 HgCl₂ 溶液消毒 6~12min(时间视材料的幼嫩程度而定), 然后用无菌水冲洗数次, 将灭菌后的无菌外植体放在无菌滤纸上, 切成 1~2cm 长的茎段接种于诱导分化培养基上直

收稿日期: 2007-01-08

1) 基金项目: 黑龙江省森工总局科技攻关项目(K9914)

接诱导芽的分化^[3]。

2.2 培养条件

基本培养基为 MS 培养基;加入 0.9% 的琼脂, pH 值 5.8;培养室温度(23±5)℃, 光强 2000 lx, 光/暗周期 14h, 湿度 60%~70%;培养瓶在 120℃ 下高压灭菌 20min。每个激素组合均设 3 个重复, 每个重复设 10 个培养瓶, 每个培养瓶中接种 3 个外植体。

2.3 统计方法

试验数据采用 SPSS 软件中的单因素方差分析、双因素方差分析、多重比较等方法进行处理^[4]。

3 结果与分析

3.1 不同种类的外源植物激素(以下简称激素)组合及浓度对芽诱导分化影响

在芽诱导分化阶段, 添加的激素组合及浓度如表 1 所示。

表 1 不同激素组合和浓度对芽诱导分化的影响

激素组合	激素浓度/mg·L ⁻¹	芽数/个	芽高/cm	芽节间/节	节间芽/个	芽形态
6-BA+NAA	1.0+0.2	1	1.8	1	0	较细
	2.0+0.2	2	1.2	2	1	较细
	4.0+0.2	1	0.2	0	0	较细
KT+NAA	1.0+0.2	2	2.0	2	1	较粗
	2.0+0.2	2	1.2	2	1	较粗
	4.0+0.2	1	0.4	1	0	较粗
6-BA+KT+NAA	0.5+0.5+0.2	3	3.0	3	2	粗壮
	1.0+1.0+0.2	2	2.1	2	1	粗壮
	2.0+2.0+0.2	1	1.8	1	1	粗壮

一般接种 10d 后, 外植体萌动抽叶, 20d 后在叶腋处长出新芽。从表 1 看出, 当细胞分裂素浓度较低, 且有作用较弱的细胞分裂素 KT 参与时, 即 6-BA 0.5mg/L+KT 0.5mg/L+NAA 0.2mg/L, 激素组合诱导分化的芽最多, 达到 3~4 个, 芽高 3cm 左右, 芽粗壮节间多, 节间又有小芽的分化。叶片大, 腋芽增殖较多, 芽长势好。但是随着细胞分裂素 6-BA、KT 浓度增大到 2.0mg/L 时, 分化芽数减少, 高度降低, 甚至明显的抑制了芽的分化。6-BA+NAA、KT+NAA 两种激素组合也能诱导不定芽, 但随着浓度增加到 4.0mg/L, 分化芽数减少, 芽高降低, 芽生长势较弱, 增殖系数较小, 随着培养时间的延长, 不定芽变褐, 逐渐死亡。利用 SPSS 数据处理软件中单因素方差分析方法对芽的诱导分化情况进行了方差分析。结果见表 2、表 3 所示。

表 2 不同激素组合各生长因子方差分析

		平方和	自由度	均方	F 值	相伴概率
芽数	组间	3.056	5	.611	3.667	.157
	组内	.500	3	.167		
	总和	3.556	8			
芽高	组间	7.296	5	1.459	109.433	.001
	组内	.040	3	.013		
	总和	7.336	8			
芽节间	组间	5.222	5	1.044	3.133	.188
	组内	1.000	3	.333		
	总和	6.222	8			
节间芽	组间	3.056	5	.611	3.667	.157
	组内	.500	3	.167		
	总和	3.556	8			

表 3 不同激素浓度各生长因子方差分析

		平方和	自由度	均方	F 值	相伴概率
芽数	组间	1.556	2	.778	2.333	.178
	组内	2.000	6	.333		
	总和	3.556	8			
芽高	组间	4.329	2	2.164	4.319	.039
	组内	3.007	6	.501		
	总和	7.336	8			
芽节间	组间	1.556	2	.778	1.000	.422
	组内	4.667	6	.778		
	总和	6.222	8			
节间芽	组间	1.556	2	.778	2.333	.178
	组内	2.000	6	.333		
	总和	3.556	8			

从表 2 和表 3 可以看出, 芽高在 3 个激素组合和 6 个激素浓度上存在显著的差异, 相伴概率分别是 0.001 和 0.039, 明显小于临界值 0.05。而分化芽数、芽节间、节间芽 3 个生长因子在激素组合和激素浓度上差异都不显著。可见选用 6-BA 0.5mg/L+KT 0.5mg/L+NAA 0.2mg/L 组合时芽诱导分化阶段各生长因子表现最好, 为最优组合和浓度。

3.2 不同种类、不同浓度的激素组合对芽增殖生长的影响

在芽增殖培养基上激素组合方式: KT、6-BA、6-BA+KT、6-BA+NAA、KT+NAA、6-BA+KT+NAA。浓度水平: 6-BA 0.5 mg/L、1.0 mg/L、2.0 mg/L

L;KT 0.5 mg/L、1.0 mg/L、2.0 mg/L;NAA 0.05mg/L^[5]。增殖培养 15d 时观察并记录芽增殖生长情况,具体如表 4 所示。

表 4 不同激素的组合对芽增殖生长的影响

激素组合	激素浓度/ mg · L ⁻¹	增殖芽数/ 个	生长高度/ cm	芽形态
KT	1.0	3~5	0.5~1.0	弯曲
6-BA	1.0	5~8	0.5~1.0	直立较细
6-BA +KT	0.5+0.5	3~5	0.5~1.0	弯曲
KT+NAA	1.0+0.05	0	0	
6-BA+ NAA	1.0+0.05	3~5	0.5~1.2	直立较细
6-BA+ KT+NAA	2.0+2.0+0.05	5~10	1.0~1.5	直立粗壮

从表 4 中看出,在 6-BA+KT 的激素组合上,芽的增殖和生长情况同单一分裂素组合相同。激素组合 KT 1.0mg/L+NAA 0.05 mg/L 不能促进芽的增殖生长,根本没有芽的分化、增殖;而 6-BA 1.0mg/L+NAA 0.05 mg/L 组合上芽的增殖生长则明显好于 KT 激素组合,芽数 3~5 个,平均高度 0.9cm 左右,但芽的生长较细,随着继代时间的延长,在此培养基上生长的芽变褐,逐渐死亡。但如果作为辅助型的细胞分裂素和 6-BA、NAA 组合时,即 6-BA2.0mg/L+KT2.0 mg/L+NAA 0.05 mg/L 组合比单一激素组合效果好,有利于芽的增殖和生长,芽增殖数量达到 5~10 个,高达 1.0~1.5cm,芽直立粗壮,生长势强。

对在不同激素组合、不同浓度上芽增殖生长情况做单因素方差分析,结果如表 5 所示。

表 5 不同激素组合各生长因子方差分析

	平方和	自由度	均方	F 值	相伴概率
增殖芽数 组间	124.000	5	24.800	11.446	.000
组内	26.000	12	2.167		
总和	150.000	17			
生长高度 组间	1.664	5	.333	12.749	.000
组内	.313	12	.026		
总和	1.978	17			

方差分析表 5 表明:增殖芽数和生长高度在 6 个激素组合上差异均达到极其显著的水平,相伴概率分别为 0.000 和 0.000,明显小于临界值 0.05,即表明 6-BA2.0mg/L+KT2.0mg/L+NAA0.05mg/L 组合为最优芽增殖生长激素浓度组合。

3.3 不同种类、不同浓度的激素对根分化生长的影响

当培养瓶内芽长至 2~3cm 时,应及时转接到生根

培养基中。试验中生根培养基添加的生长素有 NAA、IAA、IBA 及 2,4-D;浓度水平:0.01 mg/L、0.05 mg/L、0.1 mg/L、0.5 mg/L。试验设一组对照,为不添加生长素组^[6]。生根培养 25d,观察并记录根生长情况如图 1、图 2、图 3 所示。

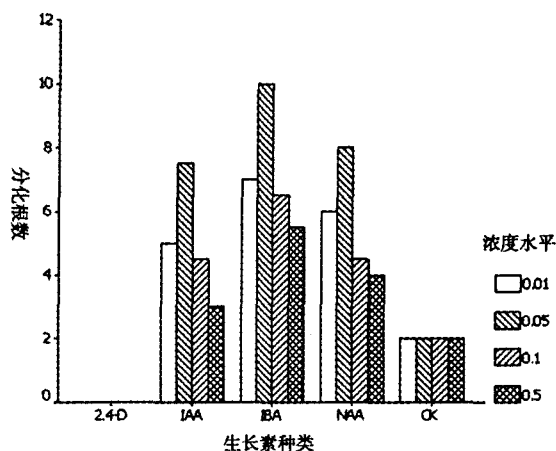


图 1 分化根数情况

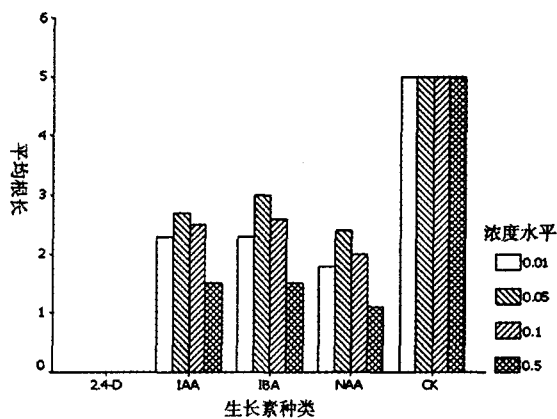


图 2 平均根长情况

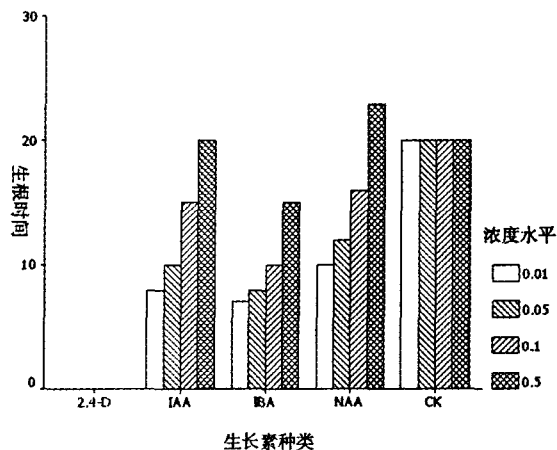


图 3 生根时间情况

从 3 个图中看出,分化根数最多的激素为 IBA,其次为 NAA、IAA、对照,而 2,4-D 不能诱导根的分化;不添加激素的对照组平均分化 2 条根;而添加 IBA、NAA、IAA 的培养基上苗木最少生 3 条根,最多生 10

条根。随着激素浓度的增加,分化根数先增多再明显减少,呈抛物线性相关。从根的长度看出:对照组根长最长 5cm,其次是 IBA、IAA、NAA。激素浓度和平均根长也呈抛物线性相关。即随着浓度的增加,平均根长先呈上升后下降趋势。但生根时间与激素浓度的相关性却与分化根数、平均根长与激素浓度的相关性不同,生根时间与激素浓度呈显著的直线性正相关,随着浓度的增加,生根所用时间也长;生根时间最短的是 IBA 0.01 mg/L 为 7d,最长的是 NAA 0.5 mg/L 为 23d。但是诱导生根的培养基中不加入激素,在继代 20d 后也有一二条根的分化,根长的有 5cm,较粗、黄色、具有较长的根毛;短的根比较细、灰色,根长 1cm,即使有根的生长,但根系生长形态较差,根长短不齐,粗细不均,还有大部分不生根。

对 3 个图中的数据进行双因素方差分析,结果见表 6 所示。

表 6 双因素方差分析

	平方和	自由度	均方	F 值	相伴概率
分化根数	激素浓度	92.687	3	30.896	12.256 .000
	激素种类	469.187	3	156.396	62.041 .000
	随机变量	121.000	48	2.521	
	总和	682.874	53		
平均根长	激素浓度	8.687	3	2.896	45.130 .000
	激素种类	58.747	3	19.582	305.182 .000
	随机变量	3.080	48	6.417E-02	
	总和	70.514	53		
生根时间	激素浓度	641.000	3	213.667	284.889 .000
	激素种类	2201.000	3	733.667	978.222 .000
	随机变量	36.000	48	.750	
	总和	2878.000	53		

由双因素方差分析表看出:分化根数、平均根长和生根时间在不同激素浓度和不同的激素种类上差异极显著。相伴概率均为 0.000,小于显著水平临界值 0.05,差异极其显著。

为了进一步确定不同激素种类和不同激素浓度水平之间存在的差异显著水平,对分化根数、平均根长和生根时间在激素种类、激素浓度水平上分别做多重比较,多重比较表略。

多重比较结果表明:IAA 与 NAA 两生长素之间相伴概率为 0.271,明显大于显著水平 0.05,差异不显著;在浓度水平上,0.01 与 0.1、0.1 与 0.5 两个浓度之间的相伴概率分别为 0.271、0.188,大于显著性水平,差异不显著;IAA 与 IBA 两生长素之间相伴概率为

0.100,两生长素上平均根长差异不显著;在浓度水平上,0.01 与 0.1 两个浓度之间的相伴概率为 0.169,大于显著性水平,差异不显著;生根时间无论在生长素种类还是浓度水平之间相伴概率都为 0.000,小于显著水平 0.05,差异极其显著。

通过分析可知:诱导无根苗生根的培养基添加生长素 IBA 浓度在 0.05 mg/L 时最适宜山葡萄的根分化生长。

4 结论与讨论

在进行山葡萄组织培养操作时,选择幼嫩的茎尖作为外植体,最优的灭菌时间为 9min,能直接建立快速再生体系。此方法具有周期短,操作简单,无性系变异小,能较好地保持遗传稳定性又远离病原体以达到脱毒的目的。山葡萄诱导培养基:MS+6-BA0.5 mg/L+KT0.5 mg/L+NAA0.2 mg/L;增殖培养基:MS+6-BA2.0mg/L+KT2.0mg/L+NAA0.05mg/L;生根培养基:MS+IBA0.05mg/L。山葡萄的组织培养操作简单,下述措施能够降低组培苗的成本,细胞分裂素 6-BA、生长素 NAA 替代 ZT、BAP、2,4-5-T;pH 值一般情况下 5.8 不需调试,近似于当地土壤的 pH 值;用旧罐瓶替代三角瓶;琼脂条代替琼脂粉浓度为 5~6 g/L。

今后山葡萄种质资源的研究应主要加强抗病、高含糖、低酸、两性花种质的发现和采集;深入开展特异性状评价工作;利用 RAPD、SSR 分子标记鉴定种质资源,绘制连锁图及目标性状基因的标记等研究上,将会对山葡萄评价和分子育种工作产生重大影响^[7]。

参 考 文 献

- [1] 周以良. 黑龙江树木志[M]. 哈尔滨:黑龙江科学技术出版社,1985:426-428.
- [2] 王金庄. 中国可持续发展林业研究与探讨[M]. 北京:中国林业出版社,2003:70.
- [3] 颜昌敏. 植物组培手册[M]. 北京:科学出版社,1990.
- [4] 余建英,何旭宏编著. 数据统计分析与 SPSS 应用[M]. 北京:人民邮电出版社,2005:143-144.
- [5] 王爱芝,沈海龙. 花椒嫩叶和茎段的愈伤组织诱导[J]. 东北林业大学学报,2005(2):12-13.
- [6] 张剑侠,王贺飞. 中国野生葡萄组织培养研究[J]. 西北植物学报,2003,23(3):460-463.
- [7] 沈育杰,赵淑兰. 我国山葡萄种质资源研究与利用现状[J]. 特产研究,2006,29:53-56.

作者简介:高金辉(1976—),女,黑龙江省汤原县人,工程师,大学,主要从事植物遗传育种与生物技术研究。

E-mail:zh1731124@126.com