

山葡萄组织培养方法<sup>1)</sup>

高金辉 王玲 张厚良 程丽华 张巍 王清君

(伊春林业科学院,伊春,153000)

**摘要** 以经过优选的山葡萄(*Vitis amurensis* Rupr.)幼嫩茎段为外植体,对适合植株再生的培养基激素配比、生根基质和生长环境进行了研究。结果表明:最优外植体诱导培养基为MS(改)+0.5 mg·L<sup>-1</sup>BA+0.5 mg·L<sup>-1</sup>KT+0.5 mg·L<sup>-1</sup>NAA;诱导出的愈伤组织容易分化成茎丛,愈伤组织转接到MS(改)+0.5 mg·L<sup>-1</sup>BA+0.1 mg·L<sup>-1</sup>NAA内产生大量的不定芽;不定芽在MS(改)+0.05 mg·L<sup>-1</sup>IBA的培养基内可诱导产生大量的根。生根试管苗驯化、移栽后,生根率最高的基质是苔藓,成活率达90%,而且在室外变温(温度12~30℃)的环境条件下生根最好。

**关键词** 山葡萄;组织培养;激素配比;生根基质

**分类号** Q943.1

**Tissue Culture of *Vitis amurensis*/Gao Jinhui, Wang Ling, Zhang Houliang, Cheng Lihua, Zhang Wei, Wang Qingjun (Yichun Academy of Forestry, Yichun 153000, P. R. China)//Journal of Northeast Forestry University. -2007,35(7). -37~39**

The suitable medium, phytohormone mixture ratio and culture condition for plant regeneration were investigated using tender stem segments of *Vitis amurensis* Rupr. as explants. Result showed that MS medium supplemented with 0.5 mg·L<sup>-1</sup> BA, 0.5 mg·L<sup>-1</sup> KT and 0.5 mg·L<sup>-1</sup> NAA could induce callus with high potential of organogenesis. The induced calluses subcultured to MS medium supplemented with 0.5 mg·L<sup>-1</sup> BA and 0.1 mg·L<sup>-1</sup> NAA produced a great deal of adventitious shoots. MS medium supplemented with 0.05 mg·L<sup>-1</sup> IBA was suitable for rooting of shoot. The rooting rate of seedlings grown in moss medium after acclimatization and transplantation reached 90 percent, and the higher rooting capability of seedlings was found in plastic tunnels at a changeable temperature of 12 Degree C to 30 Degree C.

**Key words** *Vitis amurensis*; Tissue culture; Phytohormone mixture ratio; Rooting media

山葡萄(*Vitis amurensis* Rupr.)又名野葡萄,是葡萄科、葡萄属落叶藤本。山葡萄含有丰富的蛋白质、碳水化合物、矿物质和多种维生素,生食味酸甜可口,富含浆汁,是美味的山间野果<sup>[1]</sup>。对山葡萄组织培养的研究,国内学者以取得了一些成果。顾沛雯等用葡萄组织驯化苗为研究对象进行了小茎段扦插试验,探索出了一整套适合酿酒葡萄规模化小茎段扦插育苗的生产技术<sup>[2]</sup>;宋瑞刚等进行“双优”茎尖组织脱毒技术研究获得成功<sup>[3]</sup>;张剑侠等利用一些葡萄品种的叶片、叶柄、茎段及单芽茎段进行了离体培养研究,并从这些器官中诱导出不定芽,但诱导率很低<sup>[4]</sup>;朱波等进行了“左山”组培快繁体系的研究取得成功<sup>[5]</sup>。笔者尝试用组织培养手段来繁殖和培育伊春地区野生优质山葡萄品种,不但填补了山葡萄组培研究的空白,而且可改良当地品种,满足生产上的大量需要。

## 1 试验材料与方法

### 1.1 试验材料来源和培养

材料来源于伊春林科院中试基地经22a驯化的母树,枝条在23℃的培养室水培,每5d换1次水。培养4周后,取饱满的嫩茎作外植体。

### 1.2 外植体的处理方法

外植体先用清水加洗洁精清洗或浸泡1~2min,再用清水冲洗1~2min,装入无菌瓶内放到超净工作台上。在超净工作台上先用75%的乙醇浸泡20s,再用无菌水冲洗3次,然

后在质量浓度为1g·L<sup>-1</sup>的升汞溶液中浸泡3~5min,用无菌水冲洗3~5次,得无菌材料。每次冲洗时间需要1min以上。将嫩芽切成1~2cm长的小段接种于诱导培养基上<sup>[6]</sup>。

### 1.3 培养条件

基本培养基为经过改良的MS,20g·L<sup>-1</sup>蔗糖,7g·L<sup>-1</sup>琼脂,pH值5.8,培养温度(20±3)℃恒温,采用日光灯照射培养,光照强度1000~1500lx,光照时数12h/d,湿度为70%~80%。

### 1.4 试验设计

不定芽诱导培养:选择NAA、BA和KT3个考察因素,每个因素取2个水平,考察对山葡萄不定芽诱导的影响,因素水平安排见表1。

表1 山葡萄不定芽诱导影响因素试验设计

| 水平 | 因素/mg·L <sup>-1</sup> |     |     |
|----|-----------------------|-----|-----|
|    | BA                    | NAA | KT  |
| 1  | 0.5                   | 0.5 | 0.5 |
| 2  | 1.0                   | 1.0 | 1.0 |

增殖培养:选择NAA、IBA2个考察因素,每个因素取3个水平,考察对山葡萄芽增殖生长的影响,因素水平安排见表2。

表2 山葡萄芽增殖生长影响因素试验设计

| 水平 | 因素/mg·L <sup>-1</sup> |      |
|----|-----------------------|------|
|    | NAA                   | IBA  |
| 1  | 0.05                  | 0.05 |
| 2  | 0.10                  | 0.10 |
| 3  | 0.20                  | 0.20 |

生根培养:选择IBA作为诱导生根因素,取0.01、0.05、0.10mg·L<sup>-1</sup>3个质量浓度水平,观察对山葡萄生根的影响。

生根基质对生根率的影响:当根长到10cm左右时,苗高达到4cm时将封口膜打开,进行瓶内炼苗,3d后把生长健壮

1) 黑龙江省森工总局科研项目(K9914)。

第一作者简介:高金辉,女,1976年6月生,黑龙江省伊春林业科学院,工程师。

收稿日期:2006年10月20日。

责任编辑:程红。

的组培苗从瓶中取出,洗净培养基,用50%多菌灵800倍液进行消毒处理,移植到诱导生根的生根基质里。采用珍珠岩拌土(比例是1:2)、蛭石和苔藓3种生根基质,在塑料大棚变温散射光和培养室恒温散射光两种环境下进行生根试验。先将3种基质经过高压锅高压灭菌20 min,然后将基质装入准备好的保鲜箱内,将组培苗移植到保鲜箱中,移植时注意苗根要舒展开,然后浇透水,箱上盖,用地膜来保湿,膜上扎有小孔以便通风,每天用喷雾器喷1次水,保持湿度在90%左右。每5 d浇1次低质量浓度的营养液。定期检查箱内温度、湿度、光照生态因子等,以免对苗造成伤害。

山葡萄组培苗越冬试验:采用室外裸露法、室外土埋法、室外保鲜箱越冬法和室内保鲜箱越冬法进行越冬对比试验。

每个处理组合重复3次,每次重复做5瓶,每瓶接4个茎段。

试验中所有数据采用SPSS软件中的ANOVA和S-N-K<sup>[7]</sup>方法进行方差分析和多重比较。

## 2 结果与分析

### 2.1 初始培养阶段

外植体接种到诱导培养基上培养10 d时茎段底端开始萌动,逐渐膨大,形成绿色愈伤组织。从表3中可看出,在培养到第28天时,愈伤组织上的绿色突起已经分化出不定芽,随着BA质量浓度由0.5 mg·L<sup>-1</sup>升高到1.0 mg·L<sup>-1</sup>,愈伤分化率、芽发生率、芽长度分别从93.00%、97.00%、2.67 mm明显降低到88.67%、87.67%、2.20 mm,生长势也随之降低。

表3 不同激素组合对愈伤组织产生及分化的影响

| 激素质量浓度/mg·L <sup>-1</sup> |     |     | 接人芽数/个 | 愈伤分化率/% | 28 d时外植体变化 |        |      |
|---------------------------|-----|-----|--------|---------|------------|--------|------|
| BA                        | KT  | NAA |        |         | 芽发生率/%     | 芽长度/mm | 生长势  |
| 0.5                       | 0.5 | 0.5 | 60     | 97      | 100        | 3.1    | ++++ |
| 0.5                       |     | 0.5 | 60     | 92      | 100        | 2.8    | ++++ |
| 0.5                       | 0.5 |     | 60     | 90      | 91         | 2.1    | ++   |
| 1.0                       | 0.5 | 0.5 | 60     | 89      | 90         | 2.7    | +++  |
| 1.0                       |     | 0.5 | 60     | 90      | 83         | 2.0    | +++  |
| 1.0                       | 0.5 |     | 60     | 87      | 90         | 1.9    | ++   |

注:++生长缓慢;+++生长较显著;++++生长旺盛。

单因素方差分析(表4)表明:6种激素组合在3个性状上均差异极其显著。为了选出最优组合,进行了S-N-K多重比较分析(多重比较表略)。通过多重比较分析可知:第1种激素组合为最优,在愈伤分化率、芽发生率、芽长度3个性状上,都与其他5种组合差异显著,5种组合之间差异不十分显著或差异不显著。

表4 不同激素组合的单因素方差分析

| 性状    | 变异来源 | 平方和     | 自由度 | 均方     | F       | 显著水平P |
|-------|------|---------|-----|--------|---------|-------|
| 愈伤分化率 | 处理组合 | 117.667 | 5   | 23.533 | 47.067  | 0.000 |
|       | 误差   | 3.000   | 6   | 0.500  |         |       |
|       | 总变异  | 120.667 | 11  |        |         |       |
| 芽发生率  | 处理组合 | 466.000 | 5   | 93.200 | 279.600 | 0.000 |
|       | 误差   | 2.000   | 6   | 0.333  |         |       |
|       | 总变异  | 468.000 | 11  |        |         |       |
| 芽长度   | 处理组合 | 2.467   | 5   | 0.493  | 98.667  | 0.000 |
|       | 误差   | 0.030   | 6   | 0.005  |         |       |
|       | 总变异  | 2.497   | 11  |        |         |       |

注:显著水平P<0.05。

### 2.2 增殖培养阶段

将愈伤组织转接到添加生长素NAA、IBA的培养基中培养

21 d后,添加IBA的组合有不定芽出现,但不定芽颜色嫩绿,叶片狭小,茎纤细,数量较少,培养至30 d时,基本没有茎和叶的生长,这样的不定芽需要转接到新的培养基中以促进其营养生长<sup>[8]</sup>。而NAA诱导分化的不定芽不仅数量多,且不定芽分化出来就展叶,叶色翠绿,叶片厚而宽并有嫩绿色粗壮的茎,这样的不定芽转接到继代培养基中,继代两次后,经过30 d的培养,绝大部分不定芽已经长成生长健壮的单株。不定芽增殖生长情况见表5。从表5可以看出,随着IBA、NAA的质量浓度由0.05 mg·L<sup>-1</sup>增加到0.10 mg·L<sup>-1</sup>,不定芽数分别由7.0和3.5个上升到12.0和7.2个,不定芽的诱导率也由27%和49%上升到54%和100%,诱导率的差距由27%增加到51%。但当NAA、IBA的质量浓度为0.20 mg·L<sup>-1</sup>时,不定芽数和诱导率却呈下降趋势,不定芽数为4.7和4.3个,不定芽诱导率为78%和30%。生长素质量浓度和不定芽数、诱导率形成了稳定的抛物线关系,即生长素质量浓度为0.10 mg·L<sup>-1</sup>时,不定芽数和不定芽诱导率达到最大值。即NAA在质量浓度0.10 mg·L<sup>-1</sup>时是增殖培养阶段最优激素浓度。

表5 不定芽增殖生长试验结果

| 生长素/<br>mg·L <sup>-1</sup> | 不定芽数/个·瓶 <sup>-1</sup> |            | 不定芽诱导率/%  |          |
|----------------------------|------------------------|------------|-----------|----------|
|                            | NAA                    | IBA        | NAA       | IBA      |
| 0.05                       | 3.5±0.224              | 7.0±0.262  | 49±0.023  | 27±0.019 |
| 0.10                       | 7.2±0.281              | 12.0±0.267 | 100±0.000 | 54±0.021 |
| 0.20                       | 4.7±0.177              | 4.3±0.190  | 78±0.017  | 30±0.022 |

### 2.3 诱导生根阶段

增殖培养30 d后,当不定芽高达4~5 cm时,将其转接到生根培养基中,pH值调到5.6。当培养到28 d时,不定根生长情况见表6。从表6中可以看出:当IBA的质量浓度在0.01~0.10 mg·L<sup>-1</sup>之间时都可以诱导出不定根,但在IBA的质量浓度为0.01 mg·L<sup>-1</sup>时,诱导出的不定根数量最少,平均5.0条,平均长度在2.1 cm左右。在IBA的质量浓度为0.05 mg·L<sup>-1</sup>时不定根数量和平均长度达到最多,分别为9.0条和5.0 cm,但也存在极值最多的可达16.0条不定根,直径在0.5~1.3 mm,根颜色多为白色并且粗壮,须根极少,从茎下端放射状发出,环绕瓶底生长。IBA质量浓度在0.10 mg·L<sup>-1</sup>时,两项指标分别为6.0条和2.9 cm。显而易见,随着生长素质量浓度的增大,前期两项指标也随之增大,但在后期却变小,两者呈抛物线关系,即IBA质量浓度0.05 mg·L<sup>-1</sup>时为不定根诱导最佳质量浓度。

表6 不定芽诱导生根试验结果

| IBA质量浓度/mg·L <sup>-1</sup> | 不定根长度/cm  | 不定根条数/株   |
|----------------------------|-----------|-----------|
| 0.01                       | 2.1±0.122 | 5.0±1.173 |
| 0.05                       | 5.0±0.209 | 9.0±2.031 |
| 0.10                       | 2.9±0.209 | 6.0±1.061 |

### 2.4 炼苗与移栽阶段

一般情况下,组培苗生根是在培养瓶内培养基上进行的,出瓶时需要炼苗、驯化的过程才能生长成正常的可以在野外栽培的苗木。生根基质对生根率的影响结果(表7)表明:就生根环境来说,塑料大棚的成活率为82.00%,显著高于培养室内的成活率(71.67%);就生根基质来说,无论在塑料大棚还是培养室的环境下生根率最高的基质都是苔藓,平均成活率达到86.00%;其次是蛭石,成活率达77.50%;成活率最低的是珍珠岩拌土,成活率为67.00%。综合上述两个因素,选择在塑料大棚内(变温,温度在12~30℃)用苔藓作培养基,成活率最高达90%。方差分析结果(表8)表明:生根环境

之间、生根基质之间的差异都达到了显著水平。在试验过程中发现,组培无根苗越大,生根数量越多,根越粗壮,地上部的高生长和叶生长也非常明显。这样培育出的组培苗生长旺盛、不缓苗、移栽易成活。

表7 不同生根基质和生根环境对山葡萄根成活率的影响

| 生根环境   | 生根基质  | 移植数/个 | 成活数/个 | 成活率/% |
|--------|-------|-------|-------|-------|
| 塑料大棚变温 | 珍珠岩拌土 | 50    | 37    | 74    |
|        | 蛭石    | 50    | 41    | 82    |
|        | 苔藓    | 50    | 45    | 90    |
| 培养室恒温  | 珍珠岩拌土 | 50    | 30    | 60    |
|        | 蛭石    | 50    | 37    | 73    |
|        | 苔藓    | 50    | 41    | 82    |

表8 山葡萄根成活率的方差分析

| 变异来源 | 自由度 | 离差平方和  | 均方     | F     | 显著水平 P |
|------|-----|--------|--------|-------|--------|
| 生根环境 | 1   | 160.17 | 160.17 | 31.00 | 0.031  |
| 生根基质 | 2   | 362.33 | 181.17 | 35.06 | 0.028  |
| 误差   | 2   | 10.33  | 5.17   |       |        |
| 总变异  | 5   | 532.83 |        |       |        |

注:显著水平  $P < 0.05$ 。

## 2.5 山葡萄组培苗越冬对比试验

通过室外裸露法、室外土埋法、室外保鲜箱越冬法和室内保鲜箱越冬法进行越冬对比试验。结果表明:室内保鲜箱越冬法苗木发芽率最高,达到97%;其他方法苗木发芽率均未超过90%。2005年春季对4种方法越冬的组培苗木进行造林,造林面积为 $0.13 \text{ hm}^{-2}$ ,株行距 $1.5 \text{ m} \times 1.5 \text{ m}$ ,株数800株;同时扦插100株山葡萄硬枝作为对照组。秋季调查室内保鲜箱越冬法苗木造林成活率为80%,而3种室外方法越冬的苗木成活率却能达到92%;扦插苗成活率为70%左右。由此可见:山葡萄当年生组培苗可以稍加防寒即可在室外安全越冬,并没有造成苗木死亡及冻梢现象,抗寒性较强,而且没有病虫害发生。

## 3 结论与讨论

山葡萄的诱导以幼嫩的茎段作为外植体为好,诱导率高

达95%以上;李云等对“红地球”葡萄叶片和叶柄进行不定芽诱导,诱导率仅为16.2%和2.5%<sup>[9]</sup>。山葡萄的最佳诱导培养基是MS(改)+ $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{BA} + 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{KT} + 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{NAA}$ ;诱导出的愈伤组织容易分化成茎丛,愈伤组织转接到MS(改)+ $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{BA} + 0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{NAA}$ 内产生大量的不定芽;不定芽在MS(改)+ $0.05 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{IBA}$ 的培养基内可被诱导产生大量的根。生根试管苗驯化、移栽后,生根率最高的基质是苔藓,成活率也达90%,而且是在室外变温(温度 $12 \sim 30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ )的环境下生根最好。4种越冬方法苗木均能安全越冬。但室内保鲜箱越冬法苗木发芽率最高,达到97%;3种室外方法越冬的苗木在翌年造林时,成活率却能达到92%,而室内越冬苗却只有80%。由此可见:山葡萄当年生组培苗可以稍加防寒即可在室外安全越冬。

今后山葡萄种质资源的研究应主要集中在加强抗病、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,这将会对山葡萄评价和分子育种工作产生重大影响。

## 参 考 文 献

- [1] 周以良,董世林,聂绍荃,等.黑龙江树木志[M].哈尔滨:黑龙江科学技术出版社,1985:426-428.
- [2] 顾沛雯,龚玉梅,张召军,等.葡萄茎尖培养和快速繁殖技术研究[J].中外葡萄和葡萄酒,2004(4):16-18.
- [3] 宋瑞刚,路文鹏.山葡萄“双优”脱毒技术与遗传稳定性和生产性能的研究[J].中外葡萄和葡萄酒,2002(2):18-21.
- [4] 张剑侠,王贺飞,王承军,等.中国野生葡萄组织培养研究[J].西北植物学报,2003,23(3):460-463.
- [5] 朱波,曹后男,朴日子,等.“左山一”山葡萄组织培养快速繁育体系的研究[J].延边大学学报,2005,27(1):1-5.
- [6] 颜昌敏.植物组培手册[M].北京:科学出版社,1990:52-54.
- [7] 余建英,何旭宏.数据统计分析与SPSS应用[M].北京:人民邮电出版社,2005:143-144.
- [8] 王爱芝,沈海龙,李德斌,等.花椒嫩叶和茎段的愈伤组织诱导[J].东北林业大学学报,2005,33(2):12-13.
- [9] 李云,冯慧,王刚,等.红地球叶片、叶柄、茎段的再生体系研究[J].园艺学报,2002,29(1):60-62.

(上接36页)本植物与其它类群植物相比具有最有效的性系统,对环境具有更强的适应能力。

壶瓶山藤本植物的盛花期和盛果期避开了温度最高的7月和8月,分别在最高温到来之前的6月和之后的9月;盛花期和盛果期同样避开了降水量最多的7月。说明合适的温度和降水量,即湿润、凉爽气候有利于藤本植物的开花结果,这是因为湿润凉爽的气候有利于各种动物、微生物的活动、觅食要求和繁殖的需要,进而促进了藤本植物的传粉、繁殖和定居迁移。由此笔者认为,藤本植物的开花结果与传粉动物、微生物和果实与种子传播者之间是一种互相作用的关系,两者相互影响,相互促进,协同进化。另外,与其它类群植物相比较,藤本植物的盛花期可能是迟后的,而盛果期可能是提前的,由于没有其它类群植物开花结果的统计数据,此问题有待进一步研究。

致谢:本文得到中南林业科技大学博士生导师祁承经教授的指导,并审阅全文。

## 参 考 文 献

- [1] Gentry A H, Dodson C. Diversity and biogeography of neotropical vascular epiphytes[J]. Annals of the Missouri Botanical Garden,

1987,74:205-233.

- [2] Gentry A H. Breeding and dispersal systems of lianas[G]// Putz F E, Mooney H A. The biology of vines. Cambridge: Cambridge University Press, 1991:393-423.
- [3] Nabe-Nielsen J. Diversity and distribution of lianas in a neotropical rain forest, Yasuni National Park, Ecuador[J]. Journal of Tropical Ecology, 2001,17:1-19.
- [4] Schnitzer S A, Brongers F. The Ecology of lianas and their role in forests[J]. Trend and Evolution, 2002,17:375-376.
- [5] Senbeta F, Schmitt C, Denich M, et al. The diversity and distribution of lianas in the Afromontane rain forests of Ethiopia[J]. Diversity and Distributions, 2005,11:443-452.
- [6] 蔡永立,宋永昌.中国亚热带东部藤本植物多样性[J].武汉植物研究,2000,18(5):390-396.
- [7] 蔡永立.浙江天童森林公园藤本植物的基本特征[J].华东师范大学学报:自然科学版,1999(2):75-81.
- [8] 张国珍,杨道德.湖南壶瓶山国家级自然保护区科学考察报告集[M].长沙:湖南科学技术出版社,2004:1-43.
- [9] 祁承经,林亲众.湖南树木志.长沙:湖南科学技术出版社,2001.
- [10] 刘克明.湖南植物志:第2卷[M].长沙:湖南科学技术出版社,2000.
- [11] Croat T. Flora of Barro Colorado Island[M]. Stanford: Stanford University Press, 1978.