

DOI:10.11937/bfyy.201519007

# 葡萄试管苗的反应器培养及其移栽过程中气孔变化

修景润<sup>2</sup>, 代月<sup>2</sup>, 朴炫春<sup>1</sup>, 李美兰<sup>2</sup>, 金美玉<sup>1</sup>

(1. 延边大学 农学院, 吉林 延吉 133002; 2. 延边朝鲜族自治州农业科学院, 吉林 龙井 133400)

**摘 要:**以葡萄组培茎段为外植体, 利用气升式生物反应器接触法培养, 研究了不同蔗糖浓度对葡萄苗生长的影响, 同时在栽培后调查成活率并观察气孔行为, 以寻找一种简单、低成本及规模化培养优良葡萄苗的模式。结果表明: 当蔗糖浓度为 20 g/L 时苗的叶片颜色浓绿, 节数多, 苗和根的生长均良好。将反应器培养的葡萄苗分别移栽到蛭石和珍珠岩不同比率的移栽基质中, 发现当蛭石量多时有利于葡萄苗的成活, 单独使用蛭石的效果最佳, 移栽 30 d 后成活率达到 100%; 对反应器培养葡萄苗移栽过程中气孔进行观察, 移栽后 10 d 起部分气孔开始恢复关闭功能, 14 d 后大部分(90%以上)气孔可以关闭, 所以在对反应器葡萄苗进行移栽时, 0~10 d 需进行保湿措施, 14 d 以后可进行常规管理。

**关键词:**葡萄; 反应器; 移栽; 气孔

**中图分类号:**S 663.103.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)19-0026-04

葡萄(*Vitis vinifera* L.)属葡萄科葡萄属多年生落叶木质藤本植物, 是世界上最古老的植物之一, 在我国

已有 2 000 多年栽培历史, 葡萄营养价值极高, 含糖量高达 10%~30%, 以葡萄糖为主, 含有多量果酸、矿物质、多种维生素及多种人体所需氨基酸, 常食葡萄对神经衰弱和疲劳过度大有益处, 可生食、制成葡萄汁、葡萄干和葡萄酒<sup>[1]</sup>。目前, 葡萄繁殖主要采用嫁接<sup>[2]</sup>、扦插<sup>[3]</sup>等无性繁殖方式, 但长期无性繁殖往往易感病毒, 因此, 葡萄栽培中无病毒苗的利用显得越发重要。为了获得脱毒

**第一作者简介:**修景润(1981-), 男, 硕士, 助理研究员, 研究方向为长白山经济植物开发与利用。E-mail: jingrunxiu@163.com.

**责任作者:**金美玉(1985-), 女, 硕士, 讲师, 现主要从事植物组织培养等研究工作。E-mail: jinmeiyu@ybu.edu.cn.

**收稿日期:**2015-06-16

[8] 徐华金, 张志毅, 王莹. 花叶柳嫩枝扦插繁殖试验[J]. 林业科技开发, 2007, 21(1): 66-68.

[9] 罗忠生, 蒋志茵, 龙光远, 等. 大叶芳樟大田扦插育苗技术研究[J]. 江西林业科技, 2014, 42(2): 8-10.

[10] 梁有旺, 彭方仁, 王顺才. 楸树嫩枝扦插试验初报[J]. 林业科技开发, 2006, 20(1): 67-69.

[11] 张继妹, 傅松玲, 周耘峰, 等. 观赏石榴扦插技术研究[J]. 安徽农业大学学报, 2011, 38(4): 1-4.

[12] 王杰青, 何晓飞, 蔡平, 等. 秤锤树嫩枝扦插繁殖研究[J]. 江苏农业科学, 2011, 39(3): 243-244.

[13] 吕其根, 郝茂文. 杜仲插根育苗试验[J]. 江苏林业科技, 2001, 6(3): 29-30.

[14] 史彦江, 李行斌, 宋锋惠. 榛子引种栽培试验初报[J]. 新疆农业科学, 2001(5): 279-281.

[15] 宋锋惠, 史彦江, 卡德尔. 大果杂交榛子引种及优良品种的选育[J]. 东北林业大学学报, 2007, 35(5): 87-89.

## Effect of Different Concentration Process on Varieties of *Corylus heterophylla* × *Corylus avellana*

ZHAO Lei<sup>1</sup>, SONG Fenghui<sup>1</sup>, SHI Yanjiang<sup>1</sup>, CAO Lin<sup>2</sup>

(1. Institute of Economic Forest Research, Xinjiang Academy of Forestry Sciences, Urumqi, Xinjiang 830063; 2. Korla, Xinjiang Bureau of Parks and Woods, Korla, Xinjiang 841000)

**Abstract:** Varieties of 'New Hazel 1' (84-254), 'New Hazel 2' (82-11), 'New Hazel 3' (84-310), and 'New Hazel 4' (82-15) were used as materials, the effect of different concentration of IBA on rooting was studied. The results showed that 'New Hazel 1' was easy to be rooting than other three varieties, 'New Hazel 4' was difficult to be rooting. The concentration of 1 200—1 400 mg/L could get a good cutting effect.

**Keywords:** *Corylus heterophylla* × *Corylus avellana*; softwood cutting; IBA

苗一般采用茎尖培养,然后对脱毒苗进行组培快繁<sup>[4]</sup>。该研究利用气升式生物反应器进行葡萄苗的快繁,旨在提出一种简单、低成本及规模化大量培养葡萄苗的模式。反应器培养苗与一般组培苗一样,驯化移栽成活率的高低直接影响到快速繁殖体系的成败。试管苗培养期间始终处于高湿状态,从这种环境中移至低湿环境中,往往会因失水死亡<sup>[5]</sup>。出瓶后组培苗的成活与否,与其气孔行为和生理状态有关<sup>[6]</sup>。该试验以葡萄组培茎段作为外植体,进行生物反应器接触培养,比较在不同蔗糖浓度下葡萄苗生长状态,同时将反应器培养葡萄苗移栽后调查成活率并观察气孔行为,以期为葡萄产业化生产中苗木生产提供一种新方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试材料为葡萄砧木“5BB”品种的2年生枝条,在5℃低温条件下打破休眠后,剪成30 cm的长度,插入基质(珍珠岩:泥炭藓=3:1)中,56 d后将其剪成4 cm的大小,常规消毒并接种到附加有BA 1.0 mg/L,蔗糖30 g/L和琼脂粉7.0 g/L的MS培养基中,调节培养基的pH 5.8。在温度(25±2)℃,相对湿度70%,光照强度1 600 lx,日均光照16 h的条件下,进行芽分化诱导。待芽分化并生长至约3~4 cm时,将其从母体切下,接种在1/2MS培养基中(加入蔗糖30 g/L、琼脂粉7.0 g/L, pH 5.8)培养40 d,取茎段扩繁。取扩繁苗茎段作为生物反应器培养材料。

### 1.2 试验方法

1.2.1 反应器培养 在5 L气球型气升式生物反应器中进行接触培养。在生物反应器离底部10 cm处,用玻璃胶黏贴一硬塑料支持网架,注入2 000 mL培养基,确保培养基始终接触支持网架,将扩繁苗茎段(2 cm长带1个叶片)接种于支持网架上。在1/2MS培养基中分别加入蔗糖10、20、30 g/L,以未加蔗糖为对照,调节培养基中pH 5.8,注入150 mL/min气体,光照强度为1 600 lx,每组试验接种65个外植体,培养40 d后调查葡萄苗的增殖生长情况。

1.2.2 反应器培养葡萄苗的驯化及气孔观察 葡萄茎段接触培养40 d后,将生根的葡萄苗(株高约8 cm)从生

物反应器中取出,用自来水冲洗根表面残留的培养液后,移栽到不同基质的营养钵( $\varphi \times h = 8 \times 10$  cm)中,每种基质装入50个营养钵。设基质处理为:A,蛭石;B,1/3珍珠岩+2/3蛭石;C,1/2珍珠岩+1/2蛭石;D,2/3珍珠岩+1/3蛭石;E,河沙。葡萄苗栽入不同基质后,浇透水,并覆薄膜,置于温度为15~30℃,相对湿度11%~65%,遮光50%的温室中。移栽30 d后调查成活率。为了调查反应器培养葡萄苗移栽后叶片的气孔变化,反应器茎段培养40 d后,将带根反应器葡萄培养苗移栽在装入蛭石的营养钵中,放置在温室棚内,移栽初期,棚内需有较高空气湿度,温度保持在20~25℃,为防止强光照射,每天10:00—16:00,在营养钵上方悬挂遮阳网,移栽12 d后,无需悬挂遮阳网。然后从移栽第2~18天,每2 d调查葡萄苗叶片气孔变化;为了气孔观察,每次取3株葡萄苗,每株第4~5节的叶片。

### 1.3 项目测定

将透明无色指甲油均匀涂抹于葡萄苗叶背面,自然干燥后,薄膜翘起,用镊子将指甲油薄膜轻轻取下,置于载玻片上,保持其平滑,避免产生褶皱,盖上盖玻片制成临时装片,放在显微镜下观察,先低倍后高倍,可以清楚看到气孔的位置、数量、分布及开闭情况,用Olympus显微图像分析仪调查气孔数和大小,分别观察不同区域后,取平均值。用SPAD-502叶绿素含量测定仪葡萄苗叶片叶绿素相对含量。

### 1.4 数据分析

生物反应器试验每处理接种3个反应器作为重复,移栽试验中生长状况调查随机取10个营养钵作为重复;气孔观察,取3个叶片作为重复。利用SAS(Statistical Analysis System, Cary, NC, USA)程序,采用邓肯氏新复极差法进行比较,显著水平为0.05。

## 2 结果与分析

### 2.1 蔗糖浓度对反应器接触培养葡萄苗增殖生长的影响

由表1可以看出,蔗糖浓度为20 g/L和30 g/L的处理增殖情况差异不大,增殖苗茎叶生长正常,显著好于对照组和10 g/L处理,由此可见,蔗糖浓度过低不利于葡萄苗增殖;蔗糖浓度在20 g/L时鲜物重最多。从图1

表1 蔗糖浓度对葡萄苗增殖生长的影响

Table 1 Effect of sucrose concentration on shoot proliferation of grape *in vitro*

| 蔗糖浓度<br>Sucrose concentration/(g·L <sup>-1</sup> ) | 株高<br>Shoot length/cm | 节数<br>No. of nodes/个 | 叶绿素<br>Chlorophyll/SPAD value | 苗生物量 Plantlet biomass/(mg·株 <sup>-1</sup> ) |      | 根长<br>Root length/cm |
|--|-----------------------|----------------------|-------------------------------|---|------|----------------------|
|  |                       |                      |                               | 鲜重  | 干重   |                      |
| 0  | 2.2 b                 | 2.2 b                | 28.0 ab                       | 75 d  | 6 d  | 5.0 bc               |
| 10   | 1.5 b                 | 2.8 b                | 27.1 b                        | 154 c                                       | 14 c | 4.4 c                |
| 20   | 8.1 a                 | 7.4 a                | 31.5 a                        | 600 a                                       | 62 a | 6.7 ab               |
| 30   | 7.3 a                 | 7.4 a                | 28.4 ab                       | 468 b                                       | 49 b | 7.3 a                |

注:为0.05显著水平的多重比较结果。下同。

Note: Mean separation within columns by Duncan's multiple range test at  $P \leq 0.05$ . The same below.

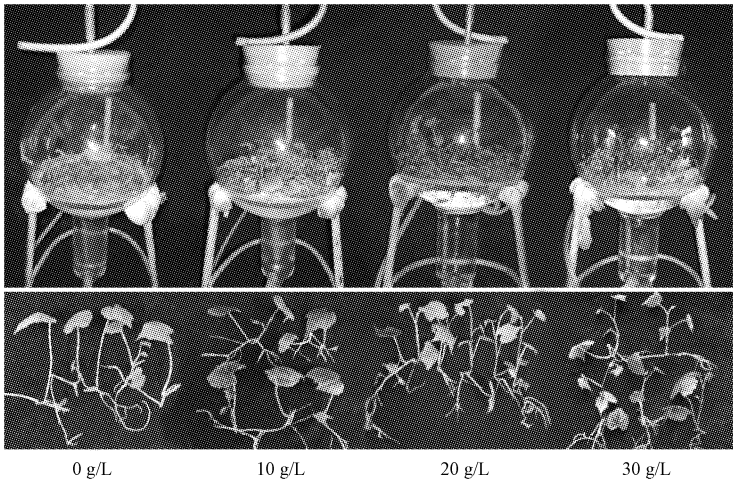


图1 在生物反应器中不同蔗糖浓度下培养40 d后葡萄苗的增殖生长

Fig. 1 Effect of sucrose concentrations on shoot proliferation of grape after 40 days of bioreactor culture

也可以看出,对照组和10 g/L处理增殖苗成活率低,长势慢;20 g/L处理成活率达到100%,长势正常;30 g/L处理增殖苗出现衰弱状态。因此,蔗糖浓度为20 g/L时葡萄苗增殖生长效果最佳。

2.2 生物反应器培养葡萄苗的驯化及气孔观察

反应器培养的葡萄苗在不同移栽基质中培养30 d后调查成活率,发现移栽基质中蛭石越多苗成活率越高,在单独使用蛭石的基质中移栽苗全部成活,且叶片颜色深绿,叶片厚,生长健壮。在蛭石与珍珠岩混合比例小时,移栽后期出现叶片颜色不正常,甚至部分死亡。基质为河沙的处理,驯化效果最差,成活率仅为45%。所以,葡萄苗移栽驯化时用蛭石作为基质为佳。

从表2可以看出,每隔2 d观察以蛭石为移栽基质的驯化苗叶表气孔的变化。0~8 d时气孔长度保持不变,均为27.3 μm,宽度略有减小;10 d时气孔长度增加

到27.9 μm,宽度继续减小;12~18 d时,气孔长度增加到28.1 μm,宽度减少至20.4 μm,并维持不变。根据气孔长度和宽度的比值得知,10 d以后,气孔开始趋于关闭状态。

从表2还可看出,移栽0~8 d时,所有气孔均处于张开状态;第10~12天时,发现有关闭的气孔,气孔关闭率达到20%以上,随着移栽天数的增加,气孔关闭率逐渐增大,14 d时达到94.4%,以后气孔基本关闭。从图3也可以看出,随着驯化移栽天数的增加,气孔逐渐恢复关闭能力。由此可知,驯化苗移栽14 d后,已逐渐适应外界环境,可进行常规管理。

表2 葡萄组培苗驯化移栽过程中叶表气孔的变化

| Table 2 Change of stomata of grape leaves during transplant |                 |                |                       |                                 |
|---|-----------------|----------------|-----------------------|---------------------------------|
| 培养天数<br>Plant period/d                                      | 长度<br>Length/μm | 宽度<br>Width/μm | 长度/宽度<br>Width/Length | 气孔关闭率<br>Stomatal close ratio/% |
| 0   | 27.3 c          | 21.1 a         | 1.29                  | 0 c                             |
| 2   | 27.3 c          | 21.1 a         | 1.29                  | 0 c                             |
| 4   | 27.3 c          | 21.1 a         | 1.29                  | 0 c                             |
| 6   | 27.3 c          | 20.7 b         | 1.32                  | 0 c                             |
| 8   | 27.3 c          | 20.6 b         | 1.33                  | 0 c                             |
| 10  | 27.9 b          | 20.4 c         | 1.37                  | 20.1 b                          |
| 12  | 28.1 a          | 20.4 c         | 1.38                  | 28.3 b                          |
| 14  | 28.1 a          | 20.4 c         | 1.38                  | 94.4 a                          |
| 16  | 28.1 a          | 20.4 c         | 1.38                  | 98.7 a                          |
| 18  | 28.1 a          | 20.4 c         | 1.38                  | 98.6 a                          |

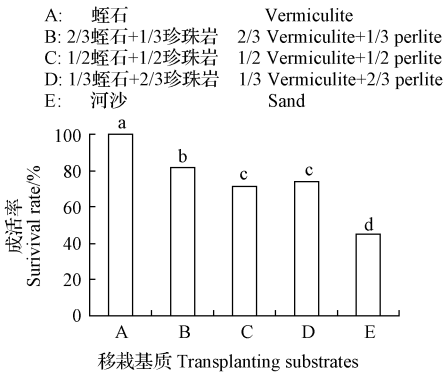


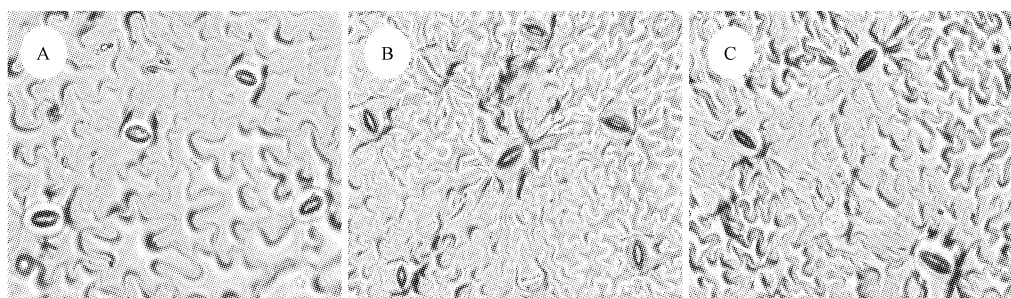
图2 不同移栽基质对反应器培养葡萄苗移栽成活率的影响

Fig. 2 Effect of different stromals on survival rate of plantlets derived from bioreactor culture

3 讨论与结论

在植物组织培养中,培养基需要添加外源糖为植物细胞提供能量来源,同时能够较好地调节培养基内的渗透压。随蔗糖浓度的提高,能源物质和碳源供给达到饱和,这时蔗糖浓度再进一步提高,仅起到调节培养基的渗透压作用<sup>[7]</sup>。





注:A,移栽 0 d;B,移栽后 8 d;C,移栽后 16 d。

Note: A, 0 day; B, 8 days; C, 16 days.

图 3 葡萄组培苗驯化移栽过程中叶表气孔的变化

Fig. 3 Change of stomata in grape leaves during transplanting

叶是维管植物营养器官之一,其功能是进行光合作用合成有机物,并通过蒸腾作用提供根系从外界吸收水和矿质营养的动力,叶片气孔的开放程度对其光合作用强度有较大的影响。很多研究人员曾对植物叶片气孔变化规律进行过广泛研究<sup>[8-9]</sup>。一般组培苗气孔在培养期间始终处于开放状态,所以栽植前最好先打开培养容器的盖子 2~3 d,增强小苗对外界的适应性,驯化前期,需覆盖塑料薄膜以保温保湿,适宜温度为 20~25℃,湿度控制在 80%~90%为宜,避免阳光直射,逐渐适应外界环境条件后,可接受直射光,把塑料薄膜逐渐打开炼苗<sup>[10]</sup>。该试验研究发现,利用气升式生物反应器培养的葡萄苗,培养基中蔗糖浓度为 20 g/L 时增殖生长效果最好;葡萄组培苗驯化移栽 10 d 起,气孔开始趋于关闭状态,第 14 天后已基本关闭,表明组培苗在形态、结构、生理等方面已向正常苗转化,可以适应外界环境,此后,不必人工生境控制可自然生长。

### 参考文献

- [1] 陈玉庆. 葡萄酒的成分与营养价值[J]. 酿酒, 2004, 31(5): 112-114.
- [2] 郑平生, 赵贵宾, 康天兰, 等. 我国葡萄嫁接栽培研究进展[J]. 北方园艺, 2009(7): 146-148.
- [3] 张玉星. 果树栽培学各论[M]. 北京: 中国农业出版社, 2003.
- [4] 张爱华, 容新民, 李玉国. 组织培养脱毒技术在新疆葡萄快繁中的应用[J]. 农业科技通报, 2008(4): 49-50.
- [5] 袁惠君, 宋占午, 丁兰, 等. 人参试管苗与移栽成活苗气孔行为的比较[J]. 西北师范大学学报, 2001, 37(4): 89-92.
- [6] 袁惠君, 宋占午, 杨红, 等. 草莓试管苗与土培苗气孔形态和气孔密度的比较[J]. 兰州理工大学学报, 2004, 30(5): 79-80.
- [7] 徐志刚, 崔瑾, 焦学磊. 光照强度和 CO<sub>2</sub> 浓度间接调控对甘薯无糖组培苗光合特性的影响[J]. 南京农业大学学报, 2004, 27(1): 11-14.
- [8] 赵惠祥, 顾乃良, 张文庆. 珠美海棠试管苗移栽前后气孔及根系状况的观察[J]. 华北农学报, 1990, 5(3): 52-55.
- [9] 李睿, 赵赵丽, 毛艇, 等. 水稻剑叶气孔性状 QTL 分析[J]. 中国水稻科学, 2010, 6(24): 659-662.
- [10] LU P, ZHANG S Q, WILLIAM H. Sucrose: a solute that accumulates in the guard-cell apoplast and guard-cell symplast of open stomata[J]. FEBS Letters, 1995, 3(62): 180-184.

## Plantlet Culture in Bioreactor and the Changes of Leave Stomata During Transplanting of Grape

XIU Jingrun<sup>2</sup>, DAI Yue<sup>2</sup>, PIAO Xuanchun<sup>1</sup>, LI Meilan<sup>2</sup>, JIN Meiyu<sup>1</sup>

(1. Agriculture College, Yanbian University, Yanji, Jilin 133002; 2. Yanbian Academy of Agricultural Sciences, Longjing, Jilin 133400)

**Abstract:** In order to explore a simple and low cost method for large scale production of plantlets in grape, with grape tissue cultured stem as explant, used air-lift bioreactor with raft method to study effect of sucrose concentrations on plantlet growth. Meanwhile, survival rate and stoma were observed after transplanting. The results showed that 20 g/L sucrose promoted plantlet growth, the plantlets with more numbers of node, deep green leaves, and high shoot and root biomass were obtained. The plantlets harvested from bioreactors were transplanted into substrates containing different amount of vermiculite and perlite, vermiculite was favorable for plantlet survive, all plantlets survived in the substrate which contained sole vermiculite. The close function in several stomata began from 10 days after transplanted, and the most of stomata were closed after 14 days. Therefore, the plantlets from bioreactors required moisture from beginning to 10 days after transplanted, and regular management was needed after 14 days after transplanted.

**Keywords:** grape; bioreactor; transportation; stomata