

梨矮化中间砧 S<sub>5</sub> 离体增殖的研究

罗 娅, 汤浩茹, 李秀梅

(四川农业大学林学院园艺学院, 雅安 625014)

**摘 要:** 采用 L<sub>16</sub>(4<sup>4</sup>) 正交试验对梨矮化中间砧 S<sub>5</sub> 进行了离体增殖研究, 结果表明, 不同种类的培养基及不同配比的植物生长调节剂对试管苗增殖的效果不同。MS 培养基较 QL、AS、WPM 培养基更有利于 S<sub>5</sub> 茎的增殖, 中等浓度的细胞分裂素(BA) 与较低浓度的生长素(IBA)、赤霉素(GA<sub>3</sub>) 配合使用效果更理想。综合茎质量、茎数量以及茎长度等指标认为, MS+2.0 mg/L BA+0.1 mg/L IBA+1 mg/L(毫克/升) GA<sub>3</sub> 是 S<sub>5</sub> 试管苗茎增殖的最佳培养基。

**关键词:** 梨; 矮化中间砧; S<sub>5</sub>; 离体培养; 增殖

**中图分类号:** S661.2 S603.6 **文献标识码:** B **文章编号:** 1001-0009(2005)01-0058-03

目前, 矮化密植已成为国内外果树发展的总趋势。实践证明, 梨树的矮化密植具有使树体矮小, 便于管理, 早结果, 早丰产, 效益好, 果品质量好等多种优点。实现梨矮化密植的途径主要有 3 种: 利用具有矮化性状的矮化砧或矮化中间砧; 选用紧凑型品种; 利用植物生长调节剂。利用矮化砧或矮化中间砧使树体矮化是实现梨矮化密植最有效的途径。

S<sub>5</sub> 是中国农科院果树所选育的优良梨属矮化中间砧, 株型为紧凑矮壮型, 抗寒力中等, 抗腐烂病和枝干轮纹病, 早果且丰产性好<sup>[1~3]</sup>, 与砀山酥梨、早酥梨等品种亲和性好, 接口平滑, 作梨树中间砧矮化效果好<sup>[1]</sup>。有关梨离体快速繁殖的研究报道较多, 而关于梨矮化砧木组织培养快繁的报道还很少<sup>[4~6]</sup>。本实验探讨了不同种类的培养基以及不同浓度配比的植物生长调节剂对 S<sub>5</sub> 梨矮化中间砧试管苗增殖的效应, 寻出 S<sub>5</sub> 的最佳增殖培养基配方, 为其中在生产中广泛推广应用

与今后梨矮化砧木的工厂化育苗提供可靠的技术与理论依据。

1 材料

于 2002 年早春(2 月底~3 月中旬)从四川农业大学梨品种园取 S<sub>5</sub> 带芽的枝条, 取内层茎尖(Shoot-tip)为材料。

2 方法

2.1 外植体的建立

内层茎尖用 75% 的酒精消毒 30 s(秒), 无菌水冲洗一次, 再用 0.1% 升汞浸泡 20 min~25 min(分钟), 无菌水冲洗 3~4 次后用滤纸吸干水分, 接入 AS+2.0 mg/L BA+0.2 mg/L IBA+3 mg/L(毫克/升) GA<sub>3</sub> 培养基中, 4 周后转管, 建立起无菌材料。

2.2 培养条件

培养温度为 25℃, 光强 4 800 Lx(勒克斯), 每天光照 16 h(小时)。

表 1 S<sub>5</sub> 增殖正交试验方案 L<sub>16</sub>(4<sup>4</sup>)与结果统计

试验号	培养基	BA (mg/L)	IBA (mg/L)	GA <sub>3</sub> (mg/L)	接种总数	增殖倍数	平均茎 鲜重(g)	平均茎 干重(g)	平均茎苗 高度差(cm)
1	1(MS)	1(1.0)	1(0)	1(0)	92	3.06	0.3271	0.0716	0.47
2	1	2(2.0)	2(0.1)	2(1)	95	5.67	0.8262	0.134	0.71
3	1	3(3.0)	3(0.2)	3(2)	82	5.83	0.8288	0.1217	1.2
4	1	4(5.0)	4(0.4)	4(4)	89	2.94	1.1833	0.1457	2.04
5	2(AS)	1	2	3	91	2.44	0.377	0.0723	0.54
6	2	2	1	4	91	3.64	0.4423	0.0773	0.78
7	2	3	4	1	93	3.44	0.4325	0.0771	0.64
8	2	4	3	2	92	3	0.4646	0.0794	0.76
9	3(WPM)	1	3	4	71	2.08	0.3867	0.0802	0.46
10	3	2	4	3	78	3.5	0.4835	0.0919	0.95
11	3	3	1	2	92	3	0.5096	0.088	0.98
12	3	4	2	1	99	3.18	0.6783	0.1057	1.02
13	4(QL)	1	4	2	90	4.06	0.5599	0.0943	1.22
14	4	2	3	1	94	4.75	0.5451	0.0918	1.53
15	4	3	2	4	83	3.64	0.6226	0.1024	1.84
16	4	4	1	3	84	2.83	0.6814	0.1054	1.32

2.3 茎的增殖

按 L<sub>16</sub>(4<sup>4</sup>) 正交实验设计(表 1), 从已建立的无菌材料中

取 2.0 cm(厘米)左右的茎段接种于不同处理组合的培养基上, 35 d(天)后统计增殖倍数、平均茎长度、平均茎鲜重和干重。实验重复 3 次, 实验结果(表 1)采用邓肯氏新复极差检验法进行统计分析。

3 结果与分析

3.1 不同种类培养基对试管苗增殖的影响

\*教育部优秀青年资助计划基金与四川省“十五”育种攻关基金资助项目。

收稿日期: 2004-09-14

表 2 不同种类培养基对 S<sub>5</sub>' 的增殖效果

培养基	平均茎		增殖倍数	平均茎苗 高度差(cm)
	鲜重(g)	干重(g)		
1(MS)	0.7914 A a	0.1271 AB b	4.3750 A a	1.3708 A a
4(QL)	0.6023 B b	0.1082 AB b	3.8200 B b	1.2200 AB ab
3(WPM)	0.5145 C c	0.2416 A a	2.9400 C c	0.8608 AB bc
2(AS)	0.4291 D d	0.0766 B b	3.0467 C c	0.7475 B c

不同种类培养基对 S<sub>5</sub> 试管苗增殖有显著影响(表 2)。MS 培养基最有利茎鲜重的增加,茎的分化和茎的伸长。MS 培养基中产生的茎叶片大、叶色浓绿、茎健壮、生长速度快。WPM 培养基有利于茎干重的增加,对茎鲜重、增殖倍数的增加和茎的伸长效果不明显。WPM 培养基中产生的茎叶片小,叶色黄绿,生长速度慢。QL 培养基中产生的茎各项指标均介于 MS 与 WPM 培养基之间。AS 培养基完全不适合 S<sub>5</sub> 试管苗茎的增殖,茎生长速度很慢且质量差(图 1)。

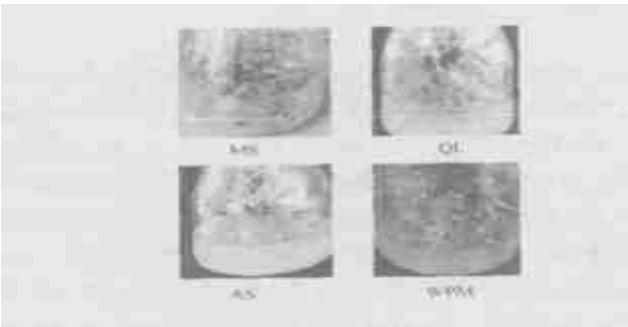


图 1 不同种类培养基中 S<sub>5</sub>' 的生长表现

表 3 不同浓度 BA 对 S<sub>5</sub>' 的增殖效果

BA (mg/L)	平均茎		增殖倍数	平均茎苗 高度差(cm)
	鲜重(g)	干重(g)		
5.0	0.7519 A a	0.1161 AB b	2.9875 C c	1.2633 A a
3.0	0.5984 B b	0.2582 A a	3.9775 B b	1.1183 AB a
2.0	0.5743 C c	0.1004 B b	4.3067 A a	1.1767 AB a
1.0	0.4127 D d	0.0787 B b	2.9100 C c	0.6408 B b

3.2 不同浓度 BA 对试管苗增殖的影响

不同浓度 BA (1 mg/L~5 mg/L(毫克/升))对茎增殖有显著性影响(表 3)。茎鲜重与茎主干高随 BA 浓度升高而增加,但茎增殖数量却在减少。说明高浓度的 BA 会抑制茎的增殖,且玻璃化现象严重。3.0 mg/L(毫克/升)BA 有利于茎干重的积累,2.0 mg/L(毫克/升)BA 最有利于茎的增殖,但对茎鲜重、干重的增加与茎的伸长效果一般。1.0 mg/L(毫克/升)BA 对 S<sub>5</sub> 茎增殖效果不好。从整体来考虑,2.0 mg/L(毫克/升)BA 为 S<sub>5</sub> 试管苗茎增殖的最佳细胞分裂素浓度。

表 4 不同浓度 IBA 对 S<sub>5</sub>' 的增殖效果

IBA (mg/L)	平均茎		增殖倍数	平均茎苗 高度差(cm)
	鲜重(g)	干重(g)		
0.4	0.6648 A a	0.1074 b	3.4850 B b	1.0433 ab
0.1	0.6260 B b	0.1078 b	3.7325 A a	1.3175 a
0.2	0.5563 C c	0.0970 b	3.9150 A a	0.9875 ab
0	0.4901 D d	0.2412 a	3.0492 C c	0.8508 b

3.3 不同浓度 IBA 对试管苗增殖的影响

添加一定浓度 IBA 对茎增殖倍数、鲜重、干重及高度的增加有显著影响(表 4)。IBA 浓度的升高有利于茎鲜重的增加,但却不利于茎干重的积累。0.2 mg/L(毫克/升)IBA 对茎数量的增加效果最好,0.1 mg/L(毫克/升)IBA 能显著促进茎的伸长,浓度过高(0.4 mg/L(毫克/升)IBA)反而抑制茎的增殖与伸长。梨矮化砧木试管苗在培养过程中反映它自身生物学特征,矮小紧凑,因此提高试管苗高度是非常重要的。本实

验认为 0.1 mg/L(毫克/升)IBA 是较为合适的生长素浓度。

表 5 不同浓度 GA<sub>3</sub> 对 S<sub>5</sub>' 的增殖效果

GA <sub>3</sub> (mg/L)	平均茎		增殖倍数	平均茎苗 高度差(cm)
	鲜重(g)	干重(g)		
4	0.6587 A a	0.1065 AB b	2.9917 C c	1.1992
2	0.5927 B b	0.1093 AB b	3.6500 B b	0.9908
1	0.5901 C c	0.2514 A a	3.9325 A a	1.0133
0	0.4958 D d	0.0863 C b	3.6075 B b	0.9958

注:多重比较采用 SSR 法进行检验,小写字母表示在 0.05 水平上显著,大写字母表示在 0.01 水平上显著。

平均茎高度差=35 d(天)后苗主干高与接种时苗主干高的平均高度差。

3.4 不同浓度 GA<sub>3</sub> 对试管苗增殖的影响

添加一定浓度 GA<sub>3</sub> 显著影响试管苗茎增殖效果(表 5)。1 mg/L(毫克/升)GA<sub>3</sub> 对茎的分化和茎干重的积累效果最好,浓度越高,有利于茎鲜重的增加,却不利于茎干重和茎数量的增多。一般认为在培养基中添加 GA<sub>3</sub> 有助于茎的伸长,但本实验结果表明,不同浓度 GA<sub>3</sub> 对 S<sub>5</sub> 试管苗茎伸长不起作用。

4 讨论

本研究结果表明:培养基、BA、IBA 和 GA<sub>3</sub> 对梨矮化中间砧 S<sub>5</sub> 试管苗培育有显著影响。王乔春对西洋梨砧木 BP10030 茎增殖时的研究认为:低离子浓度或低氮浓度的培养基有利于外植体的分化<sup>[7]</sup>。而我们的研究结果认为高盐离子浓度 MS 培养基更适合 S<sub>5</sub> 试管苗茎的生长,QL 次之,低氮培养基 WPM 和 AS 效果最差。本实验中,除增殖效果有所不同,S<sub>5</sub> 试管苗在 MS、QL 与 WPM 培养基中的表现与 BP10030 表现极为相似。MS 培养基中的茎都非常健壮,生长速度快。WPM 培养基中的茎细小成簇状,生长速度慢。QL 培养基中的茎质量介于两者之间。本实验中高盐培养基促进茎的生长与分化,低盐培养基不适合茎的生长。同一品种在不同培养基上有不同表现,不同品种在同一培养条件下表现也有所不同。作者认为,培养基种类与基因型是影响茎增殖的两个非常重要的因素,应同时考虑。

细胞分裂素和生长素是影响试管苗器官形成的主要因素<sup>[8]</sup>。本试验茎增殖主要是通过愈伤组织和腋芽增殖途径来的。茎的分化与 BA 浓度有关,一般茎增殖倍数随 BA 浓度的升高而升高,但 BA 浓度过高(5.0 mg/L(毫克/升))反而抑制茎的增殖。5.0 mg/L(毫克/升)BA 增强了茎的顶端优势,但严重阻碍了腋芽萌发,致使在叶腋处形成大量 0.5 cm(厘米)左右长度的无效茎,同时玻璃化现象严重。适当降低 BA 浓度可减弱顶端优势和玻璃化苗现象,促进腋芽萌发为有效茎,成功增殖。添加一定浓度的 IBA 能促进茎增殖与伸长,浓度过高(0.4 mg/L(毫克/升))反而起抑制作用。在培养过程中我们发现,S<sub>5</sub> 试管苗往往反映出它的生物学特性,长的矮小紧凑,0.1 mg/L(毫克/升)IBA 对茎伸长效果显著,这对 S<sub>5</sub> 试管苗的培育是非常必要的。另外,低浓度的 GA<sub>3</sub> 对茎增殖也起作用,但本实验中,GA<sub>3</sub> 对茎伸长不起作用,这可能是品种原因引起的。综合茎质量、茎数量以及茎长度等指标,适合梨矮化中间砧 S<sub>5</sub> 试管苗增殖的最佳培养基配方为 MS+2.0 mg/L BA+0.1 mg/L IBA+1 mg/L(毫克/升)GA<sub>3</sub>。

在实验过程中,我们还遇到了试管苗在 QL 培养基中芽顶端叶尖发黑以及叶片卷曲等问题,推测可能是在 QL 培养

# 圆点印迹法检测葡萄斑点病毒技术研究

刘永清<sup>1</sup>, 王国平<sup>2</sup>

(1. 湖北民族学院生命科学院, 恩施 445000;

2. 华中农业大学 湖北武汉 430070)

长期以来, 人们一直认为斑点病是葡萄扇叶病的一种, Vuittenez 等(1966 年)首先发现了该病的病原, 就该病毒的为害状、寄主范围、理化特性进行了研究, 并命名 Grapevine marbrure virus<sup>[1]</sup>。1991 年 Boscia 等鉴定了葡萄斑点病的病原为葡萄斑点病毒(Grapevine fleck virus, GFkV)<sup>[2]</sup>。该病毒分布广泛, 遍及世界各地, 其为害主要是使叶片皱缩、卷曲, 甚至可以诱发葡萄产生不同程度的矮化, 果实糖度下降<sup>3~5</sup>, 风味极差, 新梢及果穗发育不良, 扦插苗生根发芽困难<sup>[3]</sup>。本研究采用圆点印迹法对 GFkV 检测, 旨在探讨一种经济、简便、可靠的检测方法。

## 1 材料

葡萄斑点病毒多克隆抗体由意大利地中海作物病毒及类病毒研究所 Martelli 教授提供。碱性磷酸酯酶标记羊抗兔 IgG 及底物(NBT/BCIP)均购自 Promega。PVDF 膜购自 Amersham。

待检样品来源于湖北省农科院果茶所采集的葡萄胜宝的休眠枝条和叶片, 以葡萄病毒指示植物 LN33(由中国农科院辽宁兴城果树所提供)作为阴性对照。反应溶液主要涉及 Tris-Hcl 和 PBS 病毒提取液, 5% 的脱脂牛奶封闭液, 0.2% 的 PBS(pH7.4), 氯化氮蓝四唑(NBT)/5-溴-4-氯-3-吲哚磷酸(BCIP)底物缓冲液: Tris 1.21 g(克)、NaCl 0.585 g(克)、MgCl<sub>2</sub>0.112 g(克), 用 2 mol/L HCl 调节 pH 值至 9.5, 加蒸馏水定容至 100 ml(毫升)。

## 2 方法

2.1 取 0.5 g(克)葡萄韧皮部和叶组织, 分别在 1 ml(毫升)0.1 M PBS 提取缓冲液和 0.5 M 的 Tris-HCl 提取缓冲液中充分研磨, 然后在 5 000 mg/kg(毫克/公斤)的条件下离心 20 min(分钟), 收集上清液。

2.2 将 PVDF 膜剪成一定大小, 并作好标记, 用 100% 的甲醇浸湿膜 10 sec 钟, 然后用蒸馏水洗 5 min(分钟), 用 0.01 M 的 PBS 漂洗膜 5 min(分钟)。将膜放到经 0.01 MPBS 预浸润过的滤纸上, 自然晾干, 准备印迹。

2.3 吸取 2 μl 病毒提取液, 依次加到经上述处理过的 PVDF

膜上, 设 3 次重复, 自然晾干, 用含 5% 脱脂牛奶的 PBST 缓冲液封闭 1 h(小时)。为了封闭均一充分, 整个封闭过程自始至终, 均需要在脱色摇床上震荡。

2.4 用 PBST 按 GFkV 多克隆抗体的效价(1:1 000)稀释, 并将上述封闭后的膜浸入其中, 震荡孵育 1 h(小时), 然后用 PBST 洗涤 3 次, 每次洗涤 5 min(分钟)。

2.5 将 PVDF 膜放入碱性磷酸酯酶标记的羊抗兔 IgG 溶液中, 室温震荡孵育 1 h(小时), 洗涤方法同前。

2.6 取 33 μl 贮存液浓度为 100 mg/ml(毫克/毫升)的 NBT 和 35 μl 贮存液浓度为 50 mg/ml(毫克/毫升)的 BCIP, 加入 10 ml(毫升) NBT/BCIP 缓冲液, 使其终浓度分别达到 0.33 mg/ml 和 0.175 mg/ml(毫克/毫升), 室温下反应 5 min~20 min(分钟)。

2.7 用蒸馏水冲洗终止反应, 将 PVDF 膜放在滤纸上自然晾干, 肉眼或低倍放大镜上观察。

## 3 结果

以带 GFkV 的胜宝和无病毒沙地葡萄的韧皮部和叶片为材料, 分别用 0.1 MPBS 和 0.5 M 的 Tris-HCl 两种植物病毒提取液, 按 1:2 的比例研磨, 经离心后, 2 μl 点样, 每样品重复 3 次。检测结果表明: 两种病毒提取液在提取 GFkV 时效果相同, 经圆点印迹法检测, 已知的带毒材料均显示很深的紫色, 而健康的阴性材料 LN33 却呈现褐色或淡红色。选用同一植株的不同部位作为检测材料, 结果表明: 从韧皮部中粗提的病毒呈现出较深的紫色, 而从叶片中粗提的病毒却呈现较浅的紫色, 表明 GFkV 在同一植株的韧皮部中含量相对较高(见图)。



圆点印迹检测葡萄斑点病毒的结果图

注: 1, 2, 3, 4 分别来源于胜宝的韧皮部和叶片; 5, 6, 7, 8 分别来源于沙地葡萄的韧皮部和叶片; 1, 3, 5, 7 为 PBS 提取液; 2, 4, 6, 8 为 Tris-Hcl 提取液。

## 4 讨论

圆点印迹法所需样品量少, 每个样点仅 2 μl, 尤其那些不足以 ELISA 检测的珍贵少量样品能够采用此法进行检测。该法点样量少, 所需抗体数量也明显少于 ELISA, 而且只要抗体保存得当, 可以多次使用, 同样数量的抗体可以检测更多的样品, 比较适合大量样品的快速检测, 而且检测成本低。该方法不需要额外的仪器, 检测结果直观, 待检样品也能存放数月之久, 但仍存在着操作步骤稍显繁琐, 不能定量缺点。

收稿日期: 2004-08-05

基中某种元素消耗过快或缺乏所致, 具体原因有待进一步的研究。

## 参考文献:

- [1] 刘志民, 王有年, 张鹏. 梨树三高栽培技术[M]. 中国农业出版社, 1996.
- [2] 傅玉瑚, 中连长. 梨高效优质生产新技术[M]. 中国农业出版社, 1997.
- [3] 龙兴柱. 现代中国果树栽培(落叶果树卷)[M]. 中国林业出版社, 1998.

- [4] 孟庆田, 赵惠祥等. 紧凑型矮化梨组织培养获得完整试管苗[J]. 天津农林科技, 1994(1): 3~5.
- [5] 陈荃, 高彦明, 赵占军. 诱导梨矮化砧木 OH×F<sub>5</sub> 试管苗生根的正交试验[J]. 兰州大学学报(自然科学版), 2001, 2: 71~75.
- [6] 刘利民, 蒲莉玲. 植物生长调节剂对梨矮化砧木 M<sub>51</sub> 离体芽生长的影响[J]. 天水师专学报, 1999(1): 65~66.
- [7] 王乔春. 培养种类对梨试管苗茎增殖的影响[J]. 四川农业大学学报, 1993, 11(1): 77~81.
- [8] 王乔春. 植物生长调节剂对梨试管苗培育及移栽的影响[J]. 果树科学, 1995, 12(1): 15~20.