

葡萄卷叶病毒的脱毒技术研究

顾沛雯

(宁夏大学 农学院,宁夏 银川 750021)

【摘要】 【目的】建立葡萄离体培养快繁体系,探索葡萄组培苗的脱毒技术,以防治葡萄卷叶病的发生。【方法】依据葡萄茎尖分化、伸长和生根 3 阶段中所需激素比例的不同,以 1/2 MS、B<sub>5</sub> 和 GS 为基础培养基,并适当调节激素之间的比例,筛选适合不同时期的最佳培养基;同时研究了葡萄微茎尖大小、热处理方式和时间、不同病毒钝化剂处理等对葡萄组培苗的脱毒效果。【结果】筛选出从葡萄茎尖分化到生根的最佳激素配比,其培养时间比常规微茎尖培养缩短 12~19 d;在脱毒处理中,将热处理与茎尖培养相结合,使成活率和脱毒率较单纯茎尖培养提高 7.5%和 8.5%,其中变温比恒温处理成活率提高 15.6%,而脱毒率相差不大;病毒钝化剂处理与微茎尖相结合培养结果表明,病毒钝化剂对葡萄病毒具有良好的抑制作用,但对茎尖的生长发育有影响。【结论】葡萄微茎尖培养与热处理及病毒钝化剂处理相结合,是葡萄组培苗较好的脱毒方法。

【关键词】 葡萄卷叶病毒;微茎尖培养;热处理;病毒钝化剂;脱毒技术

【中图分类号】 S436.631.1<sup>+</sup>9      【文献标识码】 A      【文章编号】 1671-9387(2008)05-0085-07

Study on techniques of elimination of Grapevine roll-leaf virtus

GU Pei-wen

(Agricultural College, Ningxia University, Yinchuan, Ningxia 750021, China)

**Abstract:** 【Objective】 Building system of grape tissue culture for speeding propagation and rearching technology of virus-free grape test-tub seedlings are the most effective protection measures for grapevine leaf-roll virus (GLRaV). 【Method】 From stem tip differentiation to stem elongate and radication, tissue culture plant needed hormone in various proportions. Through adjusting hormone in various proportions as 1/2 MS, B<sub>5</sub> and GS basic culture media, the optimum culture media in three stages were selected. The virus-free elimination effect in tissue culture of stem tip, heat treatment model and time and different virus passivator treatment were also studied. 【Result】 At three stages, a series of culture media with the optimum hormone proportions was prepared, which could shorten the culture time by 12—19 days as compared with the media used commonly. Cooperation between heat treatment and tissue virus-free culture of stem tip, the survival rate of the seedling and GLRaV elimination rate increased 7.5% and 8.5% respectively, compared with singlar tissue Virus-free culture of stem tip. Moreover, in the survival rate, the changable heat treatment increased 15.6% while the GLRaV effect in grapevine showed little difference. The addition of virus passivor in media can inhibit propagation of virus. It, however, had negative effect on the survival rate of seedling. 【Conclusion】 It was better virus-free method combining the tissue virus-free culture of stem tip with heat treatment and virus passivaor treatment.

**Key words:** Grapevine leaf-roll virus (GLRaV); tissue culture of stem tip; heat treatment; virus passivation; elimination of virus

\* [收稿日期] 2007-05-23  
[基金项目] 宁夏回族自治区自然科学基金项目(nz0619);宁夏大学自然科学基金项目  
[作者简介] 顾沛雯(1969—),女,宁夏银川人,副教授,博士,主要从事植物病毒学研究。E-mail:gupeiwen2005@yahoo.com.cn

宁夏贺兰山东麓地区是我国最佳酿酒葡萄生态区之一。近年来,该地区葡萄产业发展迅速,但随着葡萄种植面积的不断扩大,许多企业和部门盲目调用和购买国内外的葡萄砧木和品种,在未经病毒检测的情况下大面积种植,造成葡萄病毒病蔓延。据 1999~2001 年对宁夏主要葡萄种植基地的 64 个葡萄砧木和品种的调查,有 21.5% 的砧木和品种带有葡萄卷叶病毒<sup>[1]</sup>。葡萄感染卷叶病毒后,果粒着色差,糖度低,风味变淡,果穗偏少,生长势较弱,树体营养积累也较少,造成越冬期间抗寒力差,容易发生冻害,一般减产 20% 左右<sup>[2]</sup>,严重影响了宁夏葡萄和葡萄酒生产的进一步发展。

葡萄病毒种类多,分布广,危害大。截止 2000 年,全世界报道的葡萄病毒已有 47 种,其中葡萄卷叶病毒(Grapevine leafroll associated virus,简称 GLRaV)是仅次于葡萄扇叶病毒的一种世界性葡萄病毒病<sup>[3-4]</sup>。该病 18 世纪中叶在欧洲已有记载,1936 年德国的 Schen 证明,其是一种经嫁接传染的病毒病,因而苗木、接穗是该病的主要传染源。自 1979 年以来,美、德、瑞士、日本等国的科学家相继观察到葡萄卷叶病的病毒粒体,并致力于该病毒的分离工作<sup>[3-6]</sup>。葡萄卷叶相关病毒为线状病毒属(*Closterovirus*)的成员,现在已有 8 种葡萄卷叶相关病毒(GLRaV1-8)被报道,其粒体长度在 1 400~2 200 nm。经进一步研究,GLRaV-1、GLRaV-3 和 GLRaV-7 是造成葡萄卷叶病的真正病原,而 GLRaV-3 分布最广,造成的经济损失也最大<sup>[7-8]</sup>。该病毒在我国葡萄生产中发生也很普遍,尤以欧亚种葡萄品种发生最为严重<sup>[4-5]</sup>。

鉴于繁殖材料带毒是葡萄卷叶病的主要传播途径,在防治上,加强检疫及使用无病毒苗木,是防治葡萄卷叶病最有效的措施<sup>[9-11]</sup>。20 世纪 70 年代,很多国家将茎尖培养、花药培养和生物技术应用到葡萄苗脱毒,之后又将热处理和组织培养结合起来,使脱毒效率得到明显提高<sup>[6]</sup>。在我国,贾春兰等<sup>[12]</sup>利用变温处理 1~2 mm 的葡萄茎尖和葡萄试管苗,并利用 CO<sub>2</sub> 和高温短期处理茎段的方法进行了脱葡萄扇叶病毒的研究;宋润刚等<sup>[13]</sup>对山葡萄‘双优’进行热处理脱出扇叶病毒和卷叶病毒。但将葡萄茎尖培养与热处理及抗病毒药剂相结合,脱除葡萄卷叶病毒的方法尚未见报道。

本试验根据宁夏葡萄生产的实际情况,在研究葡萄茎尖培养和快繁技术的基础上,探索了热处理和生长点培养相结合、及应用病毒钝化剂与茎尖培

养相结合脱除葡萄植株体内卷叶病毒的效果,以期能为葡萄脱毒技术提供一条重要途径。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

脱毒材料‘蛇龙珠’来源于宁夏广厦葡萄酒业有限公司葡萄基地;‘白玉霓’、‘琼瑶浆’、‘白诗南’和‘西拉’来源于西夏王葡萄酒有限公司品种园;‘梅鹿辄’来源于类人首酒业有限公司葡萄品种园;‘赤霞珠’来源于玉泉营农场,树龄 4~5 年。葡萄卷叶病毒-3(GLRaV-3)的外壳蛋白(CP)抗血清、辣根过氧化物酶标羊抗兔(HRP-IgG)和无毒葡萄样品,均购于中国科学院微生物研究所;邻苯二胺购于北京鼎国生物技术有限责任公司。DG-250 型酶联仪由宁夏林业研究所提供。

### 1.2 葡萄离体培养快繁体系的建立

1.2.1 启动培养基的筛选 5 月中旬采集不同葡萄品种的 1 年生枝条,用肥皂水刷洗干净,自来水冲洗 30 min,剪取 5~6 cm 单芽茎段,用体积分数 75% 酒精浸泡数秒,消除表面气泡,再用 1 g/L 升汞消毒 5~6 min,然后接种于启动培养基(以 GS 为基本培养基,分别附加 IAA 0.1 mg/L+6-BA 0.05 mg/L、IAA 0.1 mg/L、IAA 0.2 mg/L+6-BA 0.5 mg/L、IAA 0.05 mg/L+6-BA 0.1 mg/L 和 IAA 0.05 mg/L+6-BA 0.05 mg/L,不加激素)。

1.2.2 继代培养基的筛选 取‘梅鹿辄’无菌苗,在双目解剖镜下切取 1 mm 茎尖,接种于 MS<sub>1-10</sub> 培养基(以 1/2MS 为基本培养基,分别附加 IAA 0.2 mg/L+6-BA 1.0 mg/L+KT 0.5 mg/L、IAA 0.2 mg/L+6-BA 0.5 mg/L、IAA 0.2 mg/L+6-BA 0.5 mg/L+KT 0.5 mg/L、IBA 0.2 mg/L+6-BA 0.5 mg/L+KT 0.5 mg/L、NAA 0.1 mg/L+6-BA 1.0 mg/L+KT 0.5 mg/L、NAA 0.2 mg/L+6-BA 1.0 mg/L+KT 0.5 mg/L、NAA 0.1 mg/L+6-BA 0.5 mg/L+KT 0.5 mg/L、IBA 0.2 mg/L+KT 1.0 mg/L 和 IBA 0.2 mg/L+6-BA 1.0 mg/L),20 d 后统计茎尖膨大芽丛数和膨大变绿率。

膨大变绿率/%=(20 d 后膨大芽丛数/总茎尖数)×100%。

1.2.3 增殖培养基的筛选 将膨大变绿的芽丛块切成 2~3 个带芽尖的小块,再转接到 BS<sub>1-5</sub> 培养基(以 B5 为基本培养基,分别附加 NAA 0.2 mg/L+KT 0.5 mg/L、IAA 0.2 mg/L+6-BA 1.0 mg/L、

IBA 0.2 mg/L+6-BA 0.5 mg/L、IBA 0.2 mg/L+KT 1.0 mg/L 和 IAA 0.2 mg/L+KT 0.5 mg/L) 和 GS<sub>1-5</sub> 培养基(以 GS 为基本培养基,分别附加 IAA 0.2 mg/L+6-BA 0.5 mg/L、IBA 0.2 mg/L+6-BA 1.0 mg/L、NAA 0.2 mg/L+6-BA 1.0 mg/L、NAA 0.2 mg/L 和 IBA 0.2 mg/L),20 d 后统计畸形小株数和畸形小株率。

畸形小株率/%=(20 d 后的畸形小株数/总芽尖块数)×100%。

1.2.4 生根培养基的筛选 当分化出若干畸形小株时,移栽到 MS<sub>11-15</sub> 培养基(以 1/2MS 为基本培养基,分别附加 NAA 0.2 mg/L+KT 0.5 mg/L、IAA 0.2 mg/L+6-BA 0.5 mg/L、IAA 0.2 mg/L+KT 0.5 mg/L、IAA 0.2 mg/L+6-BA 1.0 mg/L+KT 0.5 mg/L 和 IBA 0.2 mg/L),统计 20 d 后的生根情况和 30 d 后的茎节增殖情况。

生根率/%=(生根茎段数/供试茎段数)×100%;

成苗率/%=(3~5 条根和 4~5 片新叶的小苗数/供试茎段数)×100%。

### 1.3 利用微茎尖培养葡萄脱毒苗

1.3.1 茎尖大小对脱毒率的影响 取‘西拉’、‘白玉霓’和‘琼瑶浆’3 个品种的无菌苗,在双目解剖镜下切取 0.3~0.5 mm 和 0.8 mm 茎尖,在筛选出的适宜培养基上培养,形成完整植株。

1.3.2 热处理对脱毒率的影响 春季将萌发的盆栽带毒‘琼瑶浆’、‘白玉霓’、‘赤霞珠’和‘梅鹿辄’等品种葡萄苗置于自制热处理箱中,保持箱内相对湿度为 70%~80%,设置恒温(38℃)热处理 30 d 和变温(白天 38℃,夜晚 32℃)热处理 60 d 后,切取新梢,剥取 1.0~1.5 mm 微茎尖,在筛选好的培养基上培养,形成完整植株。

1.3.3 试管苗热处理时间对脱毒率的影响 将‘梅鹿辄’生根试管苗放在 LRH-250-G 型光照培养箱中,先预热处理(32℃)7 d,然后将温度升至 38℃,分别热处理 20,30,40 d 后,剥取 1~1.5 mm 茎尖,在筛选好的培养基上培养,形成完整植株。

1.3.4 病毒钝化剂处理对脱毒率的影响 剥离‘赤霞珠’、‘白玉霓’和‘琼瑶浆’3 个葡萄品种的茎尖,在含植物病毒钝化剂 WCT 和丰源宝(西北农林科技大学植物保护学院吴云锋老师提供)1 000 倍液的培养基上培养(培养基成分和激素配比与筛选好的培养基相同,处理培养基增加病毒钝化剂,对照培养基不加),形成完整植株。

### 1.4 葡萄组培苗的病毒检测

采用间接 ELISA 方法检测<sup>[14-15]</sup>葡萄组培苗的带毒情况。葡萄样品加样本缓冲液(质量比 1:1)研磨,5 000 r/min 离心 7~8 min,取上清液待用。测定时用包被缓冲液稀释成 1/10 浓度,加入酶联板,4℃冰箱过夜。GLRaV-3 兔抗血清的工作浓度为 1:2 000(体积比),辣根过氧化物酶标羊抗兔的工作浓度为 1:500(体积比)。HRP-IgG 反应底物为 0.04% 磷苯二胺和 0.15% 过氧化氢配在 0.01 mol/L 柠檬酸-磷酸(pH5.4)缓冲液中。加入酶联板后,室温避光放置 10~20 min,每孔加 50 μL 2 mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 终止反应,用酶联免疫检测仪 DG-250 测定 OD<sub>490</sub> 值,以待测样品与阴性对照的 OD<sub>490</sub> 比值(P/N)≥2.0 确定为阳性反应。

## 2 结果与分析

### 2.1 葡萄离体培养快繁体系的建立

2.1.1 外植体培养 不同葡萄品种的外植体培养结果表明,‘琼瑶浆’、‘梅鹿辄’、‘白诗南’、‘西拉’和‘蛇龙珠’5 个品种分别在 GS+IAA 0.1 mg/L+6-BA 0.05 mg/L、GS+IAA 0.1 mg/L、GS+IAA 0.2 mg/L+6-BA 0.5 mg/L、GS+IAA 0.05 mg/L+6-BA 0.1 mg/L 和 GS+IAA 0.05 mg/L+6-BA 0.05 mg/L 培养基上启动较好。除‘白诗南’外,其他 4 个品种需要的外源激素水平均较低,甚至不加激素也可以形成不定芽。可见,葡萄外植体启动主要是内源激素和营养积累的效应。

2.1.2 继代和增殖培养基的筛选 由表 1 可以看出,‘梅鹿辄’无菌苗茎尖在 MS<sub>5</sub> 和 BS<sub>5</sub> 培养基上的膨大变绿率和畸形小株生成率最高,分别为 90.0% 和 80.0%;其次为 MS<sub>1</sub> 和 BS<sub>1</sub>、GS<sub>1</sub> 培养基,膨大变绿率和畸形小株生成率为 82.9% 和 76.5%,76.5%,而其他培养基的培养效果均较差。

2.1.3 生根培养基的筛选 由表 2 可以看出,不同激素对比对葡萄试管苗的生根培养效果有明显影响,其中 MS<sub>15</sub> 的培养效果最好,20 d 的生根率达 100%,30 d 后成苗率达 97.5%;其次为 MS<sub>11</sub>,20 d 的生根率达 83.3%,30 d 后成苗率为 71.4%;而 MS<sub>12</sub>、MS<sub>13</sub> 和 MS<sub>14</sub> 的培养效果均较差。

2.1.4 不同葡萄品种的离体培养效果 从表 3 看出,在同一组培养基(MS<sub>5</sub>、BS<sub>5</sub>、MS<sub>15</sub>)上,不同品种的茎尖培养效果有明显差异。‘梅鹿辄’品种的培养效果最好,茎尖膨大变绿率、畸形小株生成率和一次成苗成活率分别达 90.9%,80.0% 和 93.8%,单芽

茎段 30 d 的茎节增殖倍数为 3.1;其次为‘琼瑶浆’品种,茎尖膨大变绿率为 76.0%,畸形小株生成率为 68.4%,一次成苗成活率为88.5%,单芽茎段 30 d 的增殖倍数为 2.8;‘蛇龙珠’和‘西拉’2 个品种的

培养效果相近,‘西拉’的膨大变绿率、畸形小株率、成苗率和 30 d 的增殖倍数均略高于‘蛇龙珠’;‘白诗南’品种在各发育阶段的培养效果均不理想,明显差于其他品种。

表 1 不同继代和增殖培养基对‘梅鹿辄’无菌苗茎尖的培养效果

Table 1 The culture effect of subculture and multiplication media to Merlot Noir

| 代号<br>Number     | 培养基成分<br>Media ingredient                        | 总茎尖数<br>Total number<br>of stem tip | 膨大芽丛数<br>Number of<br>swell tip | 膨大变<br>绿率/%<br>Rate of<br>swell tip | 代号<br>Number    | 培养基成分<br>Media ingredient                      | 畸形小株数<br>Number of<br>deformity<br>seedling | 畸形小株<br>生成率/%<br>Rate of<br>deformity<br>seedling |
|------------------|--------------------------------------------------|-------------------------------------|---------------------------------|-------------------------------------|-----------------|------------------------------------------------|---------------------------------------------|---------------------------------------------------|
| MS <sub>1</sub>  | 1/2MS+IAA 0.2 mg/L+6-BA<br>1.0 mg/L+KT 0.5 mg/L  | 41                                  | 34                              | 82.9                                | BS <sub>1</sub> | B <sub>5</sub> +NAA 0.2 mg/L+<br>KT 0.5 mg/L   | 26                                          | 76.5                                              |
| MS <sub>2</sub>  | 1/2MS+IAA 0.2 mg/L+6-BA<br>0.5 mg/L              | 25                                  | 9                               | 36.0                                | BS <sub>2</sub> | B <sub>5</sub> +IAA 0.2 mg/L+<br>6-BA 1.0 mg/L | 19                                          | 76.0                                              |
| MS <sub>3</sub>  | 1/2MS+IAA 0.2 mg/L+6-BA<br>0.5 mg/L+KT 0.5 mg/L  | 29                                  | 12                              | 41.4                                | BS <sub>3</sub> | B <sub>5</sub> +IBA 0.2 mg/L+<br>6-BA 0.5 mg/L | 15                                          | 41.7                                              |
| MS <sub>4</sub>  | 1/2MS+IBA 0.2 mg/L+6-BA<br>0.5 mg/L              | 33                                  | 14                              | 42.4                                | BS <sub>4</sub> | B <sub>5</sub> +IBA 0.2 mg/L+<br>KT 1.0 mg/L   | 22                                          | 66.7                                              |
| MS <sub>5</sub>  | 1/2MS+IBA 0.2 mg/L+6-BA<br>0.5 mg/L+KT 0.5 mg/L  | 20                                  | 18                              | 90.0                                | BS <sub>5</sub> | B <sub>5</sub> +IAA 0.2 mg/L+<br>KT 0.5 mg/L   | 16                                          | 80.0                                              |
| MS <sub>6</sub>  | 1/2MS+NAA 0.1 mg/L+6-<br>BA 1.0 mg/L+KT 0.5 mg/L | 30                                  | 9                               | 30.0                                | GS <sub>1</sub> | GS+IAA 0.2 mg/L+<br>6-BA 0.5 mg/L              | 13                                          | 76.5                                              |
| MS <sub>7</sub>  | 1/2MS+NAA 0.2 mg/L+6-<br>BA 1.0 mg/L+KT 0.5 mg/L | 49                                  | 21                              | 42.9                                | GS <sub>2</sub> | GS+IBA 0.2 mg/L+<br>6-BA 1.0 mg/L              | 28                                          | 57.1                                              |
| MS <sub>8</sub>  | 1/2MS+NAA 0.1 mg/L+6-<br>BA 0.5 mg/L+KT 0.5 mg/L | 28                                  | 2                               | 7.1                                 | GS <sub>3</sub> | GS+NAA 0.2 mg/L+<br>6-BA 1.0 mg/L              | 3                                           | 75.0                                              |
| MS <sub>9</sub>  | 1/2MS+IBA 0.2 mg/L+KT<br>1.0 mg/L                | 27                                  | 3                               | 11.1                                | GS <sub>4</sub> | GS+NAA 0.2 mg/L                                | 4                                           | 57.1                                              |
| MS <sub>10</sub> | 1/2MS+IBA 0.2 mg/L+6-BA<br>1.0 mg/L              | 30                                  | 13                              | 43.3                                | GS <sub>5</sub> | GS+IBA 0.2 mg/L                                | 0                                           | 0                                                 |

表 2 不同生根培养基对‘梅鹿辄’植株单芽茎段生根及抽苔的影响

Table 2 The effect of different rooting culture media on the radication and  
bloting of the stem with single bud from Merlot Noir

| 代号<br>Number     | 培养基成分<br>Media ingredient                       | 供试茎段数<br>Number of the<br>stem with<br>single bud | 20 d                                              |                                | 30 d                                      |                              |
|------------------|-------------------------------------------------|---------------------------------------------------|---------------------------------------------------|--------------------------------|-------------------------------------------|------------------------------|
|                  |                                                 |                                                   | 平均每茎<br>段生根数<br>Mean radication<br>number of stem | 生根率/%<br>Rate of<br>radication | 茎节增殖倍数<br>Multiple<br>of stem<br>breeding | 成苗率/%<br>Rate of<br>seedling |
| MS <sub>11</sub> | 1/2MS+NAA 0.2 mg/L+KT 0.5 mg/L                  | 30                                                | 6.1                                               | 83.3                           | 2.1                                       | 71.4                         |
| MS <sub>12</sub> | 1/2MS+IAA 0.2 mg/L+6-BA 0.5 mg/L                | 35                                                | 0                                                 | 0                              | 1.0                                       | 0                            |
| MS <sub>13</sub> | 1/2MS+IAA 0.2 mg/L+KT 0.5 mg/L                  | 41                                                | 0.3                                               | 16.8                           | 3.0                                       | 0                            |
| MS <sub>14</sub> | 1/2MS+IAA 0.2 mg/L+6-BA 1.0<br>mg/L+KT 0.5 mg/L | 29                                                | 0                                                 | 0                              | 0.4                                       | 25.0                         |
| MS <sub>15</sub> | 1/2MS+IBA 0.2 mg/L                              | 32                                                | 10.5                                              | 100                            | 3.3                                       | 97.5                         |

表 3 不同葡萄品种离体培养效果的比较

Table 3 The comparision between the effects of isolated tissue culture in different grapevine varieties

| 品 种<br>Variety          | 茎尖数<br>Number of<br>stem tip | MS <sub>5</sub>         |                                        | BS <sub>5</sub>         |                                                   | MS <sub>15</sub>        |                              | 30 d 的<br>增殖倍数<br>30 d multiple<br>of stem<br>breeding | 发育时间/d<br>Growing<br>time |
|-------------------------|------------------------------|-------------------------|----------------------------------------|-------------------------|---------------------------------------------------|-------------------------|------------------------------|--------------------------------------------------------|---------------------------|
|                         |                              | 发育个体<br>Growing<br>body | 膨大变<br>绿率/%<br>Rate of<br>swelling tip | 发育个体<br>Growing<br>body | 畸形小株<br>生成率/%<br>Rate of<br>deformity<br>seedling | 发育个体<br>Growing<br>body | 成苗率/%<br>Rate of<br>seedling |                                                        |                           |
| 琼瑶浆 Gewurztraminer      | 50                           | 38                      | 76.0                                   | 26                      | 68.4                                              | 23                      | 88.5                         | 2.8                                                    | 101                       |
| 白诗南 Chenin Blanc        | 52                           | 33                      | 63.5                                   | 19                      | 57.6                                              | 14                      | 73.7                         | 1.8                                                    | 108                       |
| 蛇龙珠 Cabernet Gernischet | 51                           | 37                      | 72.5                                   | 23                      | 62.2                                              | 19                      | 82.6                         | 2.4                                                    | 108                       |
| 西拉 Syrah                | 50                           | 39                      | 78.0                                   | 26                      | 66.7                                              | 22                      | 84.6                         | 2.6                                                    | 105                       |
| 梅鹿辄 Merlot Noir         | 22                           | 20                      | 90.9                                   | 16                      | 80.0                                              | 15                      | 93.8                         | 3.1                                                    | 101                       |

5 个供试品种从茎尖培养到成株所需的时间为 101~108 d,比国内常用培养基培养时间(120 d)缩短 12~19 d,大大加快了葡萄离体培养的速度。

2.2 利用微茎尖培养葡萄脱毒苗

2.2.1 茎尖大小对存活率和脱毒率的影响

表 4 表明,当切取茎尖长度为 0.3~0.5 mm 时,小株存

活率为 20.9%~54.9%, GLRaV 的脱毒率为 83.3%~86.4%;当切取茎尖长度在 0.8 mm 以上时,小株存活率为 68.6%~78.7%, GLRaV 的脱毒率仅为 59.5%~70.8%(图 1)。可见,随着茎尖长度的减小,存活率降低而脱毒率升高。由表 4 还可

以看出,不同品种间葡萄茎尖的存活率有较大差异,当茎尖长度为 0.3~0.5 mm 时,‘琼瑶浆’品种的小株存活率为 54.9%,而‘西拉’和‘白玉霓’2 个品种的小株存活率仅为 20.9%和 28.2%,但脱毒效果各品种间差异不甚明显。

表 4 茎尖大小对不同葡萄品种小株存活率和脱毒率的影响

Table 4 The effect of the size of stem tip on the survival rate of seedling and GLRaV elimination rate of different grape varieties

| 品种<br>Variety  | 茎尖长度/mm<br>Size of stem tip | 剥离茎尖数<br>Number of stem tip | 成株数<br>Number of seedling | 无毒株数<br>Number of virus-free seedling | 小株存活率/%<br>Rate of surviving seedling | GLRaV 脱毒率/%<br>Rate of eliminating GLRaV |
|----------------|-----------------------------|-----------------------------|---------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|------------------------------------------|
| 西拉             | 0.3~0.5                     | 86                          | 18                        | 15                                    | 20.9                                  | 83.3                                     |
| Syrah          | 0.8                         | 40                          | 28                        | 19                                    | 70.0                                  | 67.9                                     |
| 白玉霓            | 0.3~0.5                     | 78                          | 22                        | 19                                    | 28.2                                  | 86.4                                     |
| Ugni Blanc     | 0.8                         | 35                          | 24                        | 17                                    | 68.6                                  | 70.8                                     |
| 琼瑶浆            | 0.3~0.5                     | 51                          | 28                        | 24                                    | 54.9                                  | 85.7                                     |
| Gewurztraminer | 0.8                         | 47                          | 37                        | 22                                    | 78.7                                  | 59.5                                     |

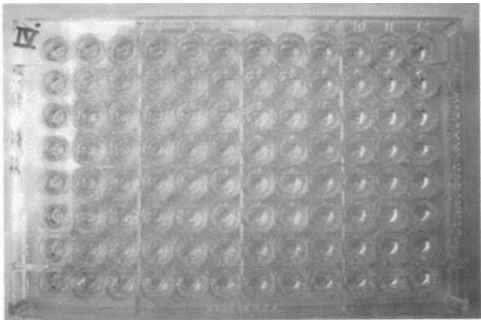


图 1 GLRaV 抗血清对葡萄脱毒苗(茎尖大小 0.8 mm)的 ELISA 检测

Fig.1 The ELISA detection of GLRaV antiserum for tissue culture seedling of grapevine (stem tip size 0.8 mm)

2.2.2 热处理对茎尖培养的脱毒效果 表 5 表明,4 个葡萄品种经恒温热处理后,剥离单芽茎尖分离培养,小株存活率和 GLRaV 脱毒率平均分别为 34.4%和 95.5%;变温热处理分别为 50.0%和 91.7%。变温热处理的小株存活率较恒温热处理提高 15.6%,而 GLRaV 脱毒率相差不大。与单纯茎尖培养(0.3~0.5 mm)相比,热处理后小株存活率和 GLRaV 脱毒率平均增加 7.5%和 8.5%。

品种间恒温和变温热处理后,小株存活率和 GLRaV 脱毒率差异较大,‘梅鹿辄’变温热处理后小株存活率达 83.3%,而其他品种普遍低于 45%;但 GLRaV 脱毒率各品种均比较高,达到 75%以上。

表 5 热处理与茎尖培养相结合对不同葡萄品种组培苗的脱毒效果

Table 5 The GLRaV elimination effect of cooperation between the heat treatment and the tissues culture of stem tip for different grape varieties

| 品种<br>Variety          | 处理<br>Treatment                | 剥离茎尖数<br>Number of stem tip | 成株数<br>Number of seedling | 无毒株数<br>Number of virus-free seedling | 小株存活率/%<br>Rate of surviving seedling | GLRaV 脱毒率/%<br>Rate of eliminating GLRaV |
|------------------------|--------------------------------|-----------------------------|---------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|------------------------------------------|
| 琼瑶浆<br>Gewurztraminer  | 恒温 Constant temperature        | 16                          | 6                         | 6                                     | 37.5                                  | 100.0                                    |
| 白玉霓 Ugni Blanc         | 恒温 Constant temperature        | 18                          | 4                         | 3                                     | 22.2                                  | 75.0                                     |
| 赤霞珠 Cabernet Sauvignon | 恒温 Constant temperature        | 14                          | 6                         | 6                                     | 42.9                                  | 100.0                                    |
| 梅鹿辄 Merlot Noir        | 恒温 Constant temperature        | 16                          | 6                         | 6                                     | 37.5                                  | 100.0                                    |
| 合计 Total               |                                | 64                          | 22                        | 21                                    | 34.4                                  | 95.5                                     |
| 琼瑶浆<br>Gewurztraminer  | 变温 Changeable heat temperature | 18                          | 8                         | 7                                     | 44.4                                  | 87.5                                     |
| 白玉霓 Ugni Blanc         | 变温 Changeable heat temperature | 8                           | 2                         | 2                                     | 25.0                                  | 100.0                                    |
| 赤霞珠 Cabernet Sauvignon | 变温 Changeable heat temperature | 10                          | 4                         | 4                                     | 40.0                                  | 100.0                                    |
| 梅鹿辄 Merlot Noir        | 变温 Changeable heat temperature | 12                          | 10                        | 9                                     | 83.3                                  | 90.0                                     |
| 合计 Total               |                                | 48                          | 24                        | 22                                    | 50.0                                  | 91.7                                     |

2.2.3 试管苗不同热处理时间的脱毒效果 由表 6 可见,‘梅鹿辄’试管苗热处理 20~30 d 生长势旺盛,茎尖容易培养成活,存活率达 85.0%以上,GL-

RaV 脱毒率也显著提高,达 90.0%以上,较单纯茎尖培养(0.3~0.5 mm)的小株存活率和 GLRaV 脱毒率分别提高 51.6%和 7.1%。

表 6 ‘梅鹿辄’试管苗不同热处理时间的脱毒效果

Table 6 The GLRaV elimination effect of the test-tube seedling from Merlot Noir at different heat treatment times

| 热处理时间/d<br>Heat treatment time | 试管苗长势<br>Test tube seedling | 接种茎尖数<br>Number of stem tip | 成株数<br>Number of seedling | 无毒株数<br>Number of virus-free seedling | 存活率/%<br>Rate of surviving seedling | GLRaV 脱毒率/%<br>Rate of eliminating GLRaV |
|--------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|---------------------------|---------------------------------------|-------------------------------------|------------------------------------------|
| 20                             | 好 Good                      | 21                          | 18                        | 17                                    | 85.7                                | 94.4                                     |
| 30                             | 较好 Better                   | 23                          | 20                        | 18                                    | 87.0                                | 90.0                                     |
| 40                             | 较差 Bad                      | 15                          | 10                        | 9                                     | 66.7                                | 90.0                                     |

2.2.4 病毒钝化剂处理对脱毒的影响 预试验时向培养基中加入 500 倍的 WCT 和丰源宝原液,结果 3 个葡萄品种供剥离茎尖数 63 个,培养 30 d 后仅有 8 个茎尖成活,茎尖虽呈绿色,稍有膨大,但无芽丛生成,生长停滞。培养基中加入 1 000 倍 WCT

和丰源宝时,GLRaV 脱毒率由原来的 39.7%提高到 76.5%和 80.0%;但药剂对茎尖生长有抑制作用,小株存活率由原来的 82.1%下降到 31.8%和 28.6%(表 7)。另外,丰源宝的 GLRaV 脱毒率略高于 WCT,说明不同品种对药剂的敏感性也不同。

表 7 病毒钝化剂处理对不同葡萄品种组培苗脱毒的影响

Table 7 The elimination effect of GLRaV on the virus passivaor treatment in different grape varieties

| W 处理<br>Treatment                                     | 品种<br>Variety          | 剥离茎尖数<br>Number of stem tip | 成株数<br>Number of seedling | 无毒株数<br>Number of virus-free seedling | 存活率/%<br>Rate of surviving seedling | GLRaV 脱毒率/%<br>Rate of eliminating GLRaV |
|-------------------------------------------------------|------------------------|-----------------------------|---------------------------|---------------------------------------|-------------------------------------|------------------------------------------|
| WCT                                                   | 赤霞珠 Cabernet Sauvignon | 42                          | 16                        | 13                                    | 38.1                                | 81.3                                     |
|                                                       | 白玉霓 Ugni Blanc         | 33                          | 8                         | 6                                     | 24.2                                | 75.0                                     |
|                                                       | 琼瑶浆 Gewurztraminer     | 32                          | 10                        | 7                                     | 31.3                                | 70.0                                     |
|                                                       | 合计 Total               | 107                         | 34                        | 26                                    | 31.8                                | 76.5                                     |
| 丰源宝<br>Fengyuanbao                                    | 赤霞珠 Cabernet Sauvignon | 39                          | 12                        | 11                                    | 30.8                                | 91.7                                     |
|                                                       | 白玉霓 Ugni Blanc         | 30                          | 6                         | 4                                     | 20.0                                | 66.7                                     |
|                                                       | 琼瑶浆 Gewurztraminer     | 36                          | 12                        | 9                                     | 33.3                                | 75.0                                     |
|                                                       | 合计 Total               | 105                         | 30                        | 24                                    | 28.6                                | 80.0                                     |
| 茎尖培养 The tis-sue virus-free cul-ture of stem tip (CK) | 赤霞珠 Cabernet Sauvignon | 27                          | 24                        | 8                                     | 88.9                                | 33.3                                     |
|                                                       | 白玉霓 Ugni Blanc         | 26                          | 20                        | 11                                    | 76.9                                | 55.0                                     |
|                                                       | 琼瑶浆 Gewurztraminer     | 42                          | 34                        | 12                                    | 81.0                                | 35.3                                     |
|                                                       | 合计 Total               | 95                          | 78                        | 31                                    | 82.1                                | 39.7                                     |

### 3 讨 论

据 Barlass 等<sup>[16]</sup>报道,葡萄从茎尖培养到成株期要历经 4 个月,前后需要更换 4 次培养基。本研究依据茎尖分化、伸长和生根 3 个阶段中所需激素比例的不同,适当调节激素间的比例,从而筛选出适合不同时期的最佳培养基配方 MS<sub>5</sub>、BS<sub>5</sub> 和 MS<sub>15</sub>,可以缩短微茎尖处理的培养时间 12~19 d,而且只需更换 3 次培养基,大大缩短了茎尖脱毒的时间。

在 3 种培养基中,首先增加 MS<sub>5</sub> 培养基中 6-BA(1.0 mg/L)和 KT(0.5 mg/L)的质量浓度,并与 IAA(0.2 mg/L)相配合,促使茎尖膨大变绿并分化出大量芽丛,抑制顶端优势,不至长成细长茎。在 BS<sub>5</sub> 培养基中去掉 IAA 和 6-BA,增加 NAA(0.2 mg/L)的质量浓度,以恢复顶端生长,增加茎的伸长。在生根培养中,去掉 KT,由 IBA(0.2 mg/L)直

接诱导根的形成。

据有关资料报道,单纯用茎尖培养或热处理的方法进行脱毒效果均不理想<sup>[9,11-12]</sup>。本研究将 2 种方法相结合运用于葡萄组培苗的培养,以充分发挥各自的脱毒效果。热处理脱毒的机理主要是使病毒发生钝化作用,延缓其在植株体内的扩散速度,而微茎尖脱毒则是根据病毒在植株体内分布不均匀、生长点几乎不含有病毒的特点,利用茎尖培养获得脱毒苗。本试验采用两者相结合的措施可以获得更好的脱毒效果。与单纯茎尖培养(0.3~0.5 mm)相比,热处理后进行茎尖培养的小株存活率和 GLRaV 脱毒率平均增加 7.5%和 8.5%,而变温热处理比恒温热处理成活率提高了 15.6%,但 GLRaV 脱毒率相差不大。

利用病毒钝化剂来防治病毒病,具有明显的抑制、钝化病毒的作用<sup>[17]</sup>。在培养基中添加适量的

WCT 和丰源宝制剂可以提高 GLRaV 脱毒率,但对茎尖的生长发育有影响,成苗率有所下降。

[参考文献]

[1] 顾沛雯,马永明,冯 娟,等.宁夏玉泉营地区葡萄卷叶病田间自然发病率调查及检测[J]. 中外葡萄与葡萄酒,2001(5):8-12.  
Gu P W, Ma Y M, Feng J, et al. Investigation of grape leafroll incidence in field plot and virus detection in Yu-Quan area of Ningxia [J]. Sino-Overseas Grapevinen and Wine, 2001(5):8-12. (in Chinese)

[2] 顾沛雯,徐福金,关晓庆.葡萄卷叶病对酿酒葡萄品种产量、品质的影响 [J]. 宁夏农学院学报,2002,23(2):16-18.  
Gu P W, Xu F J, Guan X Q. The effect of grapevine leafroll disease to yield and quality of wine grapevine [J]. Journal of Ningxia Agricultural College, 2002, 23(2):16-18. (in Chinese)

[3] 王国平,洪 霓, Ahmed Hadidi. 中国果树类病毒的发生及其研究进展 [J]. 果树科学, 2005, 22(1):51-54.  
Wang G P, Hong N, Ahmed H. Occurrence and research progress of fruit tree viroid diseases in China [J]. Journal of Fruit Science, 2005, 22(1):51-54. (in Chinese)

[4] 王引权,古勤生,陈建军,等.葡萄病毒病研究进展[J]. 果树学报,2004,21(3):258-263.  
Wang Y Q, Gu Q S, Chen J J, et al. Advance in research of grapevine viruses [J]. Journal of Fruit Science, 2004, 21(3):258-263. (in Chinese)

[5] 刘永清,王国平.葡萄病毒病研究进展[J]. 中国果树,2002,19(4):47-51.  
Liu Y Q, Wang G P. Advance in research of grapevine viruses [J]. China Fruit, 2002, 19(4):47-51. (in Chinese)

[6] 刘永清,王国平.葡萄病毒的检测与防治研究进展[J]. 植物检疫,2003,17(9):22-25.  
Liu Y Q, Wang G P. Advance in research of detection and protection of grapevine viruses [J]. Plant quarantine, 2003, 17(9):22-25. (in Chinese)

[7] Boulila M, Bocia D, Di Terlizz B, et al. Some properties of a phloem-limited non mechanically transmissible grapevine virus [J]. J Phytopathol, 1990, 129:151-158.

[8] Martelli G, Agranovsky A, Bar-Joseph M, et al. The family closteroviridae revised[J]. Archives of Virology, 2002, 147:2039-2043.

[9] 张福庆,于向军.酒用葡萄组培脱毒快繁技术[J]. 中外葡萄与葡萄酒,2001(1):14-16.

Zhang F Q, Yu X J. Study on technology of winegrape tissue culture for speeding propagation with virus-free [J]. Sino-Overseas Grapevinen and Wine, 2001(1):14-16. (in Chinese)

[10] 鲁晓燕,牛建新,冯建荣.葡萄无毒苗繁育与栽培[J]. 中外葡萄与葡萄酒,2004(5):32-34.  
Lu X Y, Niu J X, Feng J R. Propagation and culture of virus-free grape seedlings [J]. Sino-Overseas Grapevinen and Wine, 2004(5):32-34. (in Chinese)

[11] 张晓申,王慧瑜,李晓春.葡萄脱毒工厂化育苗[J]. 农业科学通讯,2005(10):45-47.  
Zhang X S, Wang H Y, Li X C. Grape industrialized detoxification seedling nursing technology [J]. Bulletin of Agricultural Science and Technology, 2005(10):45-47. (in Chinese)

[12] 贾春兰,王继方,杨建荣.葡萄扇叶病脱毒新技术的研究[J]. 农业生物技术学报,1993(1):96-99.  
Jia C L, Wang J F, Yang J R. Study on new technology of virus-free grape seedlings with GFLV [J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 1993(1):96-99. (in Chinese)

[13] 宋润刚,李昌禹,路文鹏,等.山葡萄及其杂交品种组培脱毒技术的研究[J]. 中外葡萄与葡萄酒,1996(2):22-24.  
Song R G, Li C Y, Lu W P, et al. Study on technology of *V. amurensis* Rupr. and its hybrid varieties tissue culture with virus-free [J]. Sino-Overseas Grapevinen and Wine, 1996(2):22-24. (in Chinese)

[14] Ling K, Zhu H, Petrovic N, et al. Comparative effectiveness of ELISA and RT-PCR for detecting grapevine leafroll-associated closterovirus 3 in field sample [J]. American Journal of Enology and Viticulture, 2001, 52:21-27.

[15] 蔡文启,徐绍华,莽克强,等.葡萄卷叶病毒的纯化、血清学研究及其在脱毒组培苗检测中的应用 [J]. 微生物学报,1997,37(5):387-392.  
Cai W Q, Xu S H, Mang K Q, et al. Purification, serology and detection of grapevine leaf roll virus [J]. Acta Microbiologica Sinica, 1997, 37(5):387-392. (in Chinese)

[16] Barlass M, Skene K, Woodham R, et al. Regeneration of virus-free grapevine using *in vitro* apical culture [J]. Ann Appl Biol, 1982, 101:291-295.

[17] 李隆华.苹果茎尖培养与热处理及抗病毒剂并用脱毒法[J]. 四川果树科技, 1989, 17(1):57-58.  
Li L H. Apple virus elimination technique of combining stem tip culture with heat treatment or antiviral agent [J]. Sichuan Fruit Science Technology, 1989, 17(1):57-58. (in Chinese)