

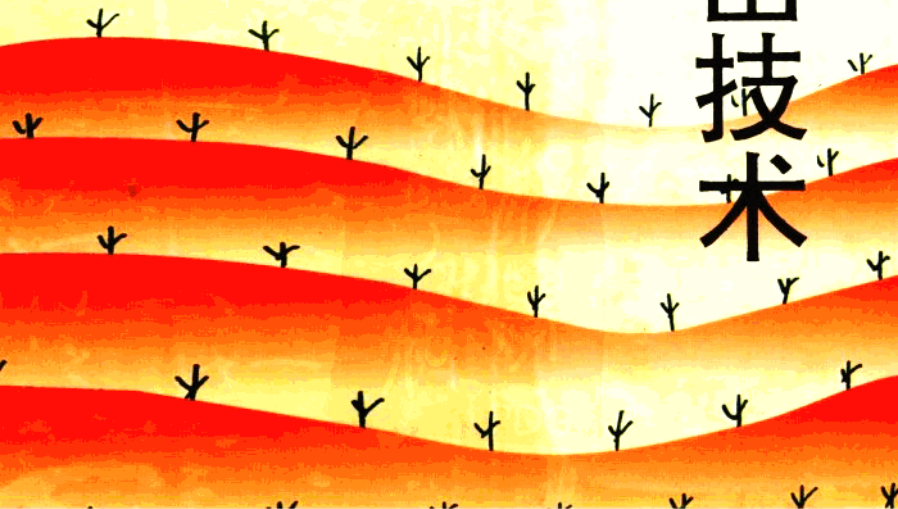
果树

无病毒育苗技术

■ 吴力游 刘学端 肖启明 / 主编
■ 江西科学技术出版社



实用农业高新技术丛书



内 容 简 介

果树病毒性病害,长期以来难以有效防治,严重影响果树产量和品质。本书分两篇介绍了解决这一难题的方法。上篇介绍了无毒育苗理论与技术方法;下篇介绍了柑桔、苹果、草莓、葡萄、香蕉等主要果树的无病毒育苗技术和方法。应用该技术培育的无毒苗木可提早挂果、提高产量和品质。

本书可供广大果树生产、科研、教学人员阅读使用。

序

果树的病毒病害在国内外都由于其为害的严重性和长期性以及防治的困难性,一直是世界上植物病理学者和果树生产者所关注的一个重要问题。近年来,由于分子生物学的进展而带来的生物技术的研究和应用以及果树病毒病的研究、防治技术的积累和发展,有可能为这一领域开创一个新的前景。

《果树无病毒育苗技术》一书共 10 章,约 20 万字,分为总论和各论两部分。既系统地介绍了这方面的基础理论和基本技术,也介绍了主要技术的具体操作步骤和方法。各论部分介绍了我国有代表性的五种果树的无病毒苗培育技术及配套技术,总论部分除了常规技术之外,也介绍了生物技术方面一些较新的检测手段,如核酸探针和 **Per** 等。在各论部分还介绍了作者们的实践经验和他们近年来的科研成果。这些,可以认为是本书的特点。

另一个可喜的特点是,本书是一批从事果树无病毒苗研究和开发利用的、有朝气的年轻学者们的通力之作。希望他们这些新的知识、技术和经验能为教学、研究和生产单位提供有益的参考。

北京农业大学生物学院

刘 仪

1994 年 3 月

前 言

为推广应用果树无病毒育苗技术,克服长期阻碍果树生产的病毒类病害问题,我们收集果树无病毒育苗这一研究领域已取得的成果,总结我们多年研究并应用这一技术所获得的经验,编成此书。全书由湖南农业大学植保系吴力游、刘学端、肖启明主编,负责拟定编写大纲、组稿,最后详细审阅、定稿。参加编写的有中国农业科学院果树所王国平,新疆石河子农学院崔星民,中国科学院华南植物研究所张海保、朱西儒,湖南农业大学石雪辉。具体分工如下。

第一章、第二章、第五章 吴力游编写;

第三章、第八章 刘学端编写;

第六章 肖启明编写;

第七章 王国平编写;

第十章 崔星民编写;

第九章 张海保、朱西儒编写;

第四章 石雪辉编写。

在编写过程中由易图永同志协助抄写,谨此致谢。

由于编者水平所限,内容难免有错误、遗漏,欢迎读者批评指正。

编 者

1994年3月于长沙

目 录

第一篇 总 论

第一章 果树病毒类病害的为害及病原	(1)
一、果树病毒类病害	(1)
二、植物病毒	(3)
(一)一般性状	(3)
(二)植物病毒的侵染	(8)
(三)植物病毒病害的症状	(10)
(四)传染方式和侵染来源	(16)
(五)植物病毒的分类和命名	(20)
三、类菌原体(MLOs)	(25)
(一)形态及结构	(25)
(二)侵染特点及症状类型	(26)
(三)传染及介体	(27)
(四)分离及培养	(28)
四、类立克次氏体(RLOs 或 RLBs)	(29)
(一)形态结构	(29)
(二)症状类型	(30)
(三)传染及介体	(30)
(四)RLOs 及 MLOs 的化学药剂反应	(30)

五、类病毒	(31)
(一)类病毒的性状	(31)
(二)类病毒的复制	(32)
(三)症状特点及致病机制	(34)
(四)类病毒的传染	(35)
第二章 果树病毒检测技术	(36)
一、指示植物检测法	(37)
(一)草本指示植物检测法	(37)
(二)木本指示植物检测法	(41)
二、血清学检测法	(45)
(一)植物病毒抗血清制备	(45)
(二)果树病毒血清学检测技术	(51)
三、电子显微镜检测法	(57)
四、分子生物学检测法	(58)
(一)检测果树病毒及类病毒的核酸探针技术	(58)
(二)聚合酶链反应及其在植物病毒检测中的应用	(63)
第三章 果树脱毒的原理和方法	(68)
一、热处理脱毒	(69)
(一)高温短时处理法	(69)
(二)低热长时处理法	(70)
二、组织培养脱毒	(72)
(一)脱毒原理	(72)
(二)培养技术	(75)
三、其它脱毒方法	(86)
(一)合并使用热处理、茎尖培养或微芽茎尖嫁接脱毒	(86)
(二)冷处理结合茎尖培养	(87)

(三)化学处理结合茎尖培养	(88)
(四)合并使用药剂、热处理脱毒	(89)
(五)培育珠心苗	(89)
第四章 果树快速繁殖的原理与技术	(91)
一、果树快速繁殖的原理	(91)
(一)植物细胞的全能性	(91)
(二)植物的再生作用	(92)
(三)细胞的分化和器官形成	(93)
二、果树快速繁殖的技术	(96)
(一)组织培养在快速繁殖上的应用	(96)
(二)茎尖培养	(98)
(三)愈伤组织培养	(106)
第五章 无病毒果树的繁育体系及无病毒果园	(115)
一、无病毒栽培的意义和成就	(115)
二、无病毒果树繁育体系的结构	(117)
(一)建立无病毒果树繁育体系的必要性	(117)
(二)国外果树无病毒繁育体系介绍	(118)
(三)我国无病毒果树繁育体系	(121)
三、无病毒母本园和无病毒苗圃	(122)
(一)结构及功能	(122)
(二)所需条件和设施	(123)
四、无病毒果园的建立	(125)
五、病毒类病原的防疫	(126)

第二篇 各 论

第六章 柑桔无病毒苗培育技术	(127)
-----------------------------	--------------

一、柑桔病毒类病害的种类及为害性	(127)
二、柑桔病毒类病害的鉴定方法	(139)
(一)指示植物鉴定法	(139)
(二)血清学方法鉴定	(143)
(三)双向聚丙烯酰胺凝胶电泳技术	(144)
(四)其它检测方法	(144)
(五)柑桔病毒类病害检测实例	(145)
三、培育柑桔无病毒苗的脱毒技术	(158)
(一)从田间选择、鉴定无毒优良母本树	(158)
(二)热处理和化学处理获得无病毒苗木	(159)
(三)珠心系避毒获得无毒苗	(160)
(四)茎尖培养脱毒	(162)
(五)茎尖嫁接脱毒	(163)
四、柑桔良种无病毒繁育体系的建立	(166)
五、柑桔无病毒容器育苗技术	(177)
(一)育苗的基础设施	(177)
(二)容器砧木苗地培育	(179)
(三)容器嫁接苗的培育	(182)
第七章 苹果无病毒育苗技术	(183)
一、苹果病毒种类和为害性	(184)
(一)非潜隐病毒	(184)
(二)潜隐病毒	(185)
(三)类似病毒病原物	(186)
(四)苹果衰退病	(186)
二、苹果病毒的鉴定和检测	(190)
(一)指示植物鉴定法	(190)

(二)血清学检测法	(196)
三、苹果脱毒技术	(199)
(一)热处理脱毒法	(199)
(二)茎尖培养脱毒法	(200)
(三)热处理与茎尖培养结合脱毒法	(205)
(四)微体嫁接脱毒法	(205)
(五)抗病毒剂的应用	(207)
四、苹果无病毒苗繁育及无病毒果园建立与管理 ...	(208)
(一)苹果无病毒苗木的繁育	(208)
(二)无病毒苹果园的建立与管理	(217)
(三)无病毒苹果的生产和结果情况	(222)
第八章 葡萄无病毒育苗技术	(225)
一、葡萄病毒及病毒病的种类和为害性	(226)
(一)葡萄病毒及病毒病种类	(226)
(二)四种主要的葡萄病毒及病毒病害	(229)
二、葡萄病毒的鉴定检测技术	(234)
(一)田间症状观察	(234)
(二)指示植物鉴定检测法	(237)
(三)血清学检测法	(243)
(四)电子显微镜检测法	(246)
三、葡萄脱毒技术	(247)
(一)热处理法	(247)
(二)生长点组织培养法	(249)
(三)热处理与组织培养结合脱毒法	(251)
(四)微体嫁接脱毒法	(252)
(五)应用抗病毒剂脱毒法	(252)

四、葡萄无病毒苗的快速繁殖	(253)
(一)茎尖培养	(253)
(二)单芽茎段快速繁殖技术	(254)
五、无病毒葡萄园的建立与管理	(257)
(一)葡萄无病毒苗繁育体系	(258)
(二)无病毒葡萄园的建立与管理	(260)
第九章 香蕉无病毒育苗技术	(262)
一、香蕉的主要病毒病	(263)
二、香蕉试管苗的病毒检测	(266)
(一)指示植物检测法	(267)
(二)血清学检测技术	(268)
三、香蕉脱毒快繁技术	(274)
(一)培养基的配制	(274)
(二)茎尖分离和接种	(276)
(三)香蕉无病毒试管苗生产中存在的问题	(280)
四、香蕉试管苗的大田栽培管理及病毒病防治	(286)
(一)香蕉试管苗的大田栽培管理	(287)
(二)病毒病的防治	(288)
第十章 草莓无病毒育苗技术	(290)
一、草莓病毒病的种类和危害性	(290)
二、草莓病毒的检测技术	(294)
(一)指示植物检测法	(295)
(二)血清学检测方法	(297)
(三)用电子显微镜检测	(298)
三、草莓的脱毒技术	(299)
(一)热处理脱毒法	(300)

(二)茎尖培养脱毒法	(300)
(三)花药培养脱毒法	(301)
四、草莓的快速繁殖技术	(302)
五、草莓无病毒果园的建立与管理	(305)
(一)草莓无病毒种苗的繁殖程序	(305)
(二)无病毒草莓种苗及果园的管理	(306)

第一篇 总 论

第一章 果树病毒类病害的为害及病原

一、果树病毒类病害

果树病毒类病害包括由病毒、类病毒及类菌原体、类细菌所引起的病害。

16 世纪人们就开始观察注意到植物病毒病害,对于其病原的认识开始于 19 世纪后期。首先注意到的是其传染性和过滤性(能通过细菌过滤器),以此与生理性病害及细菌性病害相区别。之后过滤性成为诊断病毒病的一个标志。1939 年 Kausche Pfankuch 及 Ruska 第一次用电子显微镜观察到了烟草花叶病毒粒体。

在注意到植物病毒的过滤性,并将其作为诊断病毒病害标志后的几十年中,根据这一标志,许多实际上不属于病毒病的病害,由于症状与病毒相似,多归在病毒病一类中。这些病害,大多表现黄化、矮缩及丛枝等症状,但长期以来没有确切地分离出它们的病原物,只能用嫁接方法才能使这些病害传染,有时也有叶蝉传染这类病害。1967 年土居养二等人在日

本用电镜观察证明:桑树萎缩病病株的维管束组织中,带有多量的类似菌原体的微生物,而在健康植株中则没有。从此引起了国际上对这一类病原物的研究。1973年进而又证明有一些类似立克次氏体的微生物也和一些类似病毒病的植物病害相关联。1971年起,Diener 研究马铃薯的纺锤块茎病而分离出了一种低分子量的 RNA。这种 RNA 能在寄主细胞中增殖,但没有发现它能形成完整的病毒粒体,从而将它称作类病毒。现在这三种病原物显然已经证明不属于病毒,但在研究的历史过程中,它们曾被认为是病毒病的病原物;另外这些病原物引起的病害在症状特点、为害方式、传播途径、诊断方法上都与病毒病害类似,因此现仍与病毒病害一并称之为病毒类病害。

果树多为多年生,并多以无性繁殖为主。在其长期的无性繁殖过程中,各类果树均积累感染了多种病毒类病害。这些病毒类病害有的是果树生产的严重障碍,例如柑桔黄龙病是我国南部柑桔产区的毁灭性病害。该病曾于 30 年代后期在广东潮汕地区,50 年代末 60 年代初在广东潮汕、新会和福建龙溪、福州等重要柑桔产区造成极为严重的损失。广西柳州市郊的几个国营园艺场 1956~1960 年种植的椪柑、蕉柑和甜橙 5000 亩,于 1964~1968 年几乎全部因此病而淘汰。苹果锈果病在陕西北部的绥德、米脂病株率高达 50%~80%。苹果花叶病在陕西渭北高原一些县、市果园病株率高达 30%,使树势、寿命、产量和质量均受到严重影响。枣疯病是枣树最严重的病害,多年来在华北和山东等主要产枣区流行有害,使大批枣树死亡,造成很大损失。香蕉束顶病在福建、云南、广东和广西各产区都有发生,严重的果园发病率可高达 50%~80%,

致使植株不结蕾开花,或果少而小,没有商品价值。近年来,草莓在我国大城市的郊区发展较快,已成为广大人民喜爱的一种早熟果品,但由于多种病毒类病害的为害,已给草莓生产的发展带来了不良影响。

二、植物病毒

(一)一般性状

1、形态 各种病毒的形状、大小、结构差异很大,植物病毒粒体形状主要有杆状、线状和球状三种类型。线状和杆状病毒有截头和圆头的,杆状圆头的病毒亦称为弹状病毒。另有一些杆状病毒很短而两端圆,很像杆状菌,因而称为杆状菌。线状病毒粒体一般长 $480\sim 1250\text{nm}$,宽 $10\text{nm}\sim 13\text{nm}$,个别长度可达 2000nm ,如柑桔衰退病毒。杆状病毒粒体一般长 $130\sim 300\text{nm}$,宽 $15\sim 20\text{nm}$ 。杆状菌病毒粒体一般长为宽的2倍,长 $58\sim 240\text{nm}$,宽 $18\sim 90\text{nm}$ 。球状病毒粒体的直径在 $16\sim 80\text{nm}$ 之间。同一病毒的不同粒体的大小,特别是线状病毒,其长度并不完全一致,一般是用它们的平均值来代表。有些植物病毒由几种大小或形态不同的粒体所组成,只有当这几种粒体同时存在时才能表达该病毒的全部性状。例如杜拉苹果花叶病毒(TAMV)存在3种球状粒子,其直径分别为 28 、 30 、 31nm ,葡萄保潜病毒(GBLV)和草莓潜环斑病毒(StLRSV)均由两种球状粒子构成。

2、结构和组成 植物病毒粒体由核酸和蛋白质构成。因此,从整体上看病毒是一种核蛋白复合体。就杆状和线状病毒

而言，螺旋状的核酸链位于粒体中心，成为轴心，外面是由许多蛋白质亚基组成的衣壳。蛋白质亚基也排列成螺旋状，核酸链就嵌在亚基的凹痕处。因此，杆状或线状病毒的粒体是空心的。烟草花叶病毒的结构是研究得最清楚的。它的粒体的蛋白质衣壳大致有 2100 个左右蛋白质亚基，排成 130 圈，每圈亚基之间间隔约为 $23\text{\AA}$ ，每 3 圈有 49 个蛋白质亚基，圆柱状粒体的平均直径为 $180\text{\AA}$ ，螺旋核酸链的直径为 $40\text{\AA}$ ，也就是粒体的空心直径为 $40\text{\AA}$ 。球状病毒和杆菌状病毒亦有类似的结构。常见的球状病毒大都是近似正 20 面体，衣壳由 60 个或 60 倍数的蛋白质亚基组成，蛋白质亚基不是排列成螺旋状，而是镶嵌在粒体表面，粒体的中心也是空的，但核酸的排列情况还不清楚。杆菌状和弹状病毒粒体的外面有一层含有蛋白质和脂类的鞘膜，有些球状的病毒粒体也有类似的外膜。

植物病毒粒体的成分除去核酸和蛋白质外，还含有水分、矿物质元素等。有些病毒的粒体还有脂和多胺类物质。一般一种病毒只有一种多肽链，但也有一些病毒有一种以上的多肽链，例如马铃薯黄矮病毒的衣壳蛋白质由四种多肽链组成。除衣壳蛋白质外，有些病毒还有其他的蛋白质，如酶蛋白等。各种植物病毒所含核酸和蛋白质比例不同，一般核酸约占 5%~40%，蛋白质含量占 60%~95%。植物病毒粒体长形的，核酸含量的百分率较低，而蛋白质含量则较高；粒体球状的，核酸含量的百分率较高，而蛋白质含量则较低。植物病毒蛋白质由二十余种氨基酸的残基构成，氨基酸的种类与植物正常的蛋白质差不多，但植物正常蛋白质的氨基酸种类往往要少。大多数植物病毒蛋白质的 N—基端是乙酰化了的。

一个病毒种群中包含一大群相关株系，这些株系在生物

学特性上,特别是血清学反应上,具有一定的差异。从病毒蛋白质的氨基酸含量来看,不同株系间存在着一些量和质的差异,亲缘关系越远,差异越大,说明病毒蛋白质的组成和病毒的专化性是具有一定相关性的。

病毒的核酸可以是核糖核酸(RNA)或脱氧核糖核酸(DNA),可以是单链,也可以是双链,但每一种病毒只含有一种类型的核酸。细菌和它相近的蓝绿藻以及昆虫病毒的核酸都是DNA;藻类植物和真菌病毒的核酸是RNA;脊柱动物病毒的核酸则是DNA或RNA。高等植物病毒的核酸绝大多数是RNA,并且是单链的,极少数(如三叶草伤瘤病毒)是双链的。只有个别病毒(如花椰菜花叶病毒)是双链的DNA。等直径的球状植物病毒粒体约含15%~45%的核酸,而螺旋管形的杆或线状病毒则只有5%的核酸。最小的病毒核酸为卫星病毒(分子量为 0.4×10^6),巨大的病毒核酸则为三叶草伤瘤病毒(分子量 15.5×10^6)。目前许多植物病毒核酸大分子的分子量已弄清,但知道其组成和结构的不多。

通常认为核酸决定病毒的遗传性和对植物的侵染能力,是增殖的主体。蛋白质外壳则提供对寄主的专化性和对核酸起保护作用,使之免遭核酸酶或紫外线等的破坏。也有人认为蛋白质衣壳在侵染中也起着一定的作用。

3、增殖 病毒是一种专性寄生物,只有在活的寄主细胞内才能增殖。病毒侵入活的寄主细胞后,通过改变寄主细胞的代谢途径,利用寄主细胞中的原材料、能量和酶系统来合成它的核酸和蛋白质,再组合成新的粒体。有的病毒本身携带有一些必要的酶,如复制酶。植物病毒大多为单链的RNA,其复制过程大致如下:病毒借传播媒介侵入寄主体后,进入到植物细

胞的增殖点。目前一般的看法认为,细胞原生质中的核糖体、色粒体、线粒体、微粒体和核质都可以供做病毒的增殖点。病毒必须依据这些增殖点才能进行增殖。病毒的蛋白质与核酸分开,通过 RNA 来复制新的病毒。病毒的 RNA 分子并不是直接作为模板复制新病毒的 RNA,而是先形成与之相对应的“负模板”,以“负模板”不断复制新的病毒 RNA。新形成的病毒 RNA 又起着信使 RNA 的作用,指导合成蛋白质衣壳,由其决定蛋白质亚基中氨基酸的种类和排列顺序。然后由新的病毒 RNA 和蛋白质装配成完整的病毒。

个别植物病毒的核酸是 RNA 双链螺旋体,它的增殖方式大致与其他生物 DNA 分子复制相似。还有个别植物病毒的核酸是 DNA 的双链结构,但是这种双链中的两条链的碱基不是完全配对的,相互之间的 A 和 U 以及 C 和 G 只能随着机遇而通过氢键相连,所以这种双链是不牢固的,关于这类病毒增殖的过程还不清楚。

卫星病毒不能单独增殖,只有在感染有特异性辅助病毒的植株内才能增殖,但它对于辅助病毒的复制不是必要的。例如烟草坏死病毒(TNV)的卫星病毒,它是很小的球状病毒,直径不过 17nm,单链核酸(RNA)的分子量为 0.4×10^6 ,它必须依赖于烟草坏死病毒才能增殖。

4、寄生性、致病性及其变异 病毒是一种专性寄生物,目前为止还只能从活体中发现,它存在于活体的细胞中。病毒的寄生性与寄主专化性不一致,这是它的寄生性的一个重大特点。一般专性寄生物对寄主具有高度的选择性,而病毒除少数对寄主的专化性很强外,一般对寄主的选择性均不严格,寄主范围很广,有的甚至包括几十个科的几百种植物,例如烟草花