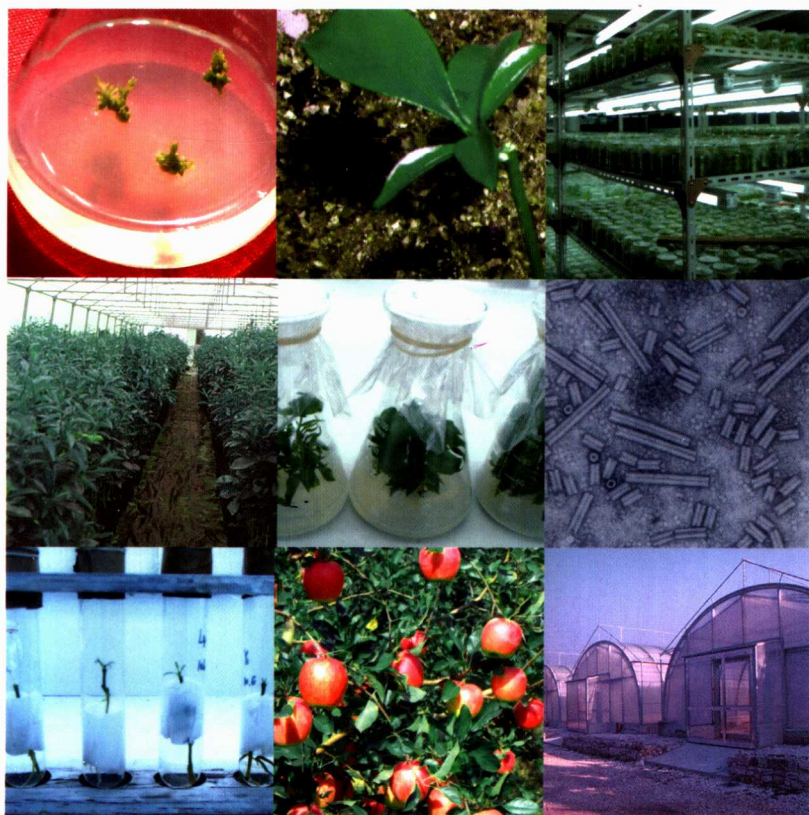


农业生物技术系列

果树的脱毒 与组织培养

王国平 洪 霓 主编



化学工业出版社
现代生物技术与医药科技出版中心

农业生物技术系列

果树的脱毒与组织培养

王国平 洪 霓 主编



化学工业出版社
现代生物技术与医药科技出版中心

· 北 京 ·

(京) 新登字 039 号

图书在版编目(CIP)数据

果树的脱毒与组织培养/王国平, 洪霓主编. —北京:
化学工业出版社, 2005. 5
(农业生物技术系列)
ISBN 7-5025-7132-9

I. 果… II. ①王…②洪… III. ①果树-植物病毒
病-防治②果树-组织培养 IV. ①S436. 6②S660. 3

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2005) 第 051566 号

农业生物技术系列

果树的脱毒与组织培养

王国平 洪霓 主编
责任编辑: 周旭
文字编辑: 咎景岩
责任校对: 陈静 宋玮
封面设计: 关飞

*

化学工业出版社 出版发行
现代生物技术与医药科技出版中心

(北京市朝阳区惠新里 3 号 邮政编码 100029)

购书咨询: (010) 64982530

(010) 64918013

购书传真: (010) 64982630

[http:// www. cip. com. cn](http://www.cip.com.cn)

*

新华书店北京发行所经销
北京永鑫印刷有限责任公司印刷
三河市东柳装订厂装订

开本 787mm×1092mm 1/16 印张 16 彩插 2 字数 389 千字

2005 年 8 月第 1 版 2005 年 8 月北京第 1 次印刷

ISBN 7-5025-7132-9

定 价: 32.00 元

版权所有 违者必究

该书如有缺页、倒页、脱页者, 本社发行部负责退换



彩图1 绿皱果病对苹果果实的危害



彩图2 石痘病对梨果实的危害



彩图3 黄龙病对柑橘果实的危害



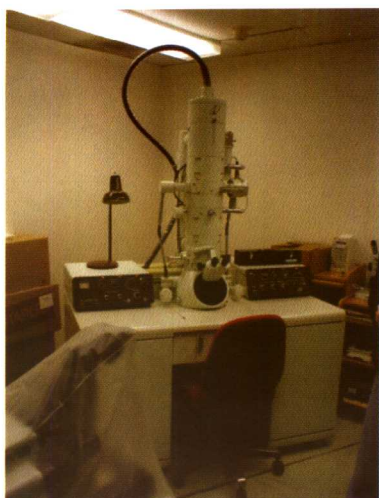
彩图4 李矮缩病毒对李树的危害



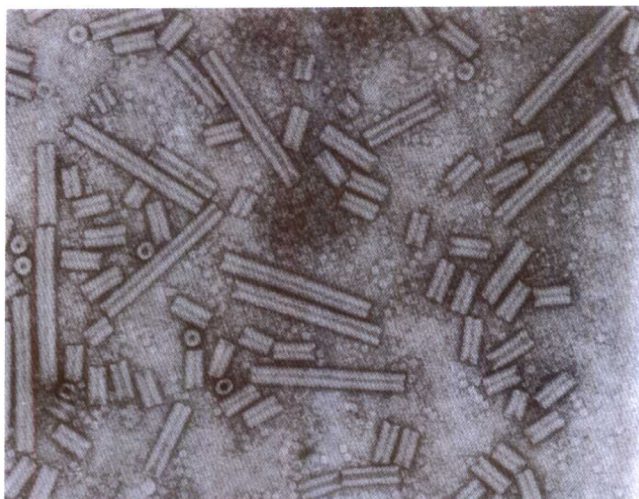
彩图5 苹果病毒木本指示植物
田间嫁接鉴定



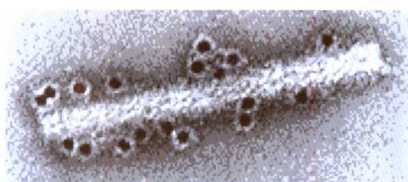
彩图6 落叶果树病毒温室鉴定



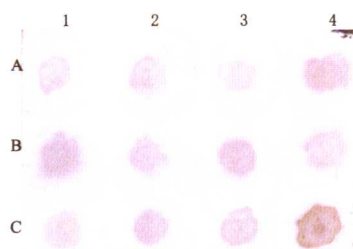
彩图7 果树病毒电镜观察



彩图8 电镜观察下的果树病毒粒子



彩图9 苹果茎沟病毒粒子免疫电镜观察



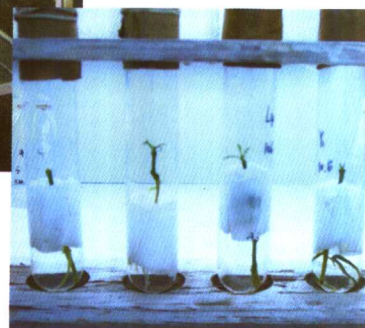
彩图10 果树病毒 Dot-ELISA 检测



彩图11
果树试管苗热处理脱毒



彩图12
果树茎尖组织培养脱毒



彩图13 柑橘微型嫁接脱毒



彩图14 柑橘微型嫁接脱毒苗



彩图15 柑橘茎尖培养脱毒苗



彩图16 梨茎尖培养脱毒苗



彩图17 梦脐橙茎尖微芽嫁接试管苗移栽成活后状况



彩图18 果树无病毒原种保存圃



彩图19 果树脱毒苗繁殖温室



彩图20 果树组培快繁材料接种



彩图21 果树无病毒组培快繁室



彩图22 果树无病毒苗温室内繁殖



彩图23 标准化容器育苗，砧木为枳橙，
生长6个月后嫁接



彩图24 无病毒苹果在山地上的生长状



彩图25 无病毒苹果结果状

《果树的脱毒与组织培养》编写人员名单

主 编 王 国 平 洪 霓

参编人员 王 国 平 洪 霓 杨 振 英

 姜 玲 郭 文 武 董 雅 凤

 苏 佳 明 张 尊 平 张 少 瑜

前 言

果树病毒病是近年来在果树生产上出现的新问题，由于其危害的严重性、长期性以及防治的困难性，一直为世界各国所关注和重视。国内外的系统研究和生产实践证明，栽培无病毒苗木是防治果树病毒病的根本对策，同时还可显著提高果树产量和果品质量，增强抗逆性和适应性。大力加强果树脱毒技术与病毒检测方法的研究与开发，培育和繁殖果树无病毒苗木，建立和完善果树良种繁育体系，逐步实现无病毒化栽培，对于提高我国果品质量，增强市场竞争能力和出口创汇能力，促进我国果树生产向优质高产高效益方向发展，具有十分重要的意义。

同时，由于植物组织培养技术具有增殖快、繁殖系数大、生产周期短等特点，且受气候、季节影响较小，便于操作，可节省大量人力物力，已成为生物科学与现代农业生产中重要的手段和技术之一，推广应用前景广阔。为此，我们组织有关专家编写了《果树的脱毒与组织培养》一书，以供农技推广人员、农业教学、科研工作者和农业科技示范户在工作中参考。

近年来，在农业部和有关省（市、自治区）果树主管部门的组织领导下，成立了由科研、教学、生产单位组成的果树无病毒栽培技术推广协作组，对加快我国果树无病毒栽培进程起到了十分重要的作用，在全国范围内推广栽培苹果、柑橘等主要果树无病毒苗木已取得良好的经济效益和生态效益。最近，农业部又分别在华中农业大学、中国农业科学院果树研究所、中国农业科学院柑橘研究所投资建立了三个国家级果树脱毒中心，以促进我国果树无病毒苗木生产迅速向产业化方向发展。华中农业大学主持承担“十五”国家 863 计划课题“主要果树新优品种脱毒苗高效快繁技术研究”和农业部 948 项目“果树病毒快速检测特殊材料及配套技术研究”，负责组织全国优势力量联合攻关并示范推广。本书是所有这些工作的结晶，是众多研究单位和科技人员及广大基层农业技术推广工作者共同努力的结果。书中所介绍的内容具有较强的科学性、先进性、实用性和可操作性，对提高果树组培快繁与病毒脱除、检测技术水平、加快无病毒栽培技术的推广应用，将会起到应有的推动作用。

本书在编写过程中得到了华中农业大学、中国农业科学院果树研究所、中国农业科学院柑橘研究所、中国农业科学院郑州果树研究所、华南农业大学、中国农业大学、中国科学院微生物研究所和植物研究所、农业部植物检疫实验所、山东农业大学、陕西省果品研究中心、四川农业大学、西南农业大学、辽宁省农业科学院果树研究所、沈阳农业大学、山东省农业科学院果树研究所、昌黎果树研究所等单位的有关专家的大力支持和热情帮助，对引用科研成果和文献资料的研究人员，在此一并深表感谢。由于编著者业务水平所限，积累的资料和经验不足，书中难免有错误和遗漏，希望读者及同行批评指正。

华中农业大学 王国平
2005 年 2 月于武汉

内 容 提 要

全书系统介绍植物组织培养实验室的规划和建设,植物组织培养常用的培养基及配制,植物组织培养的操作技术,果树组织培养技术,果树病毒病的发生与危害,果树病毒鉴定及检测技术,果树病毒脱除技术,以及果树无病毒种苗的生产及管理 etc 共性内容。同时,以柑橘、苹果、梨、葡萄、草莓、香蕉及核果类果树的脱毒、组织培养与工厂化育苗独立成章,全程化介绍各项生产和管理环节,为企业生产、管理人员提供操作手册性内容。书中列举了大量实际可行的数据、技术步骤、管理条例,方便读者系统学习、查阅和参照。

本书可以作为农业大专院校学生、硕士生教学与学习的参考书,也可作为科研应用单位、植物组织培养实验中心、工厂化育苗公司人员的实用参考手册。

目 录

第一章 概述	1
第一节 植物组织培养研究概况	1
一、植物组织培养的概念	1
二、植物组织培养原理	1
三、植物组织培养的意义和作用	2
第二节 果树病毒病研究现状及发展方向	3
一、果树病毒的研究进展	3
二、果树病毒病的防治	4
三、我国果树病毒研究存在的问题	5
四、果树病毒研究发展趋势	5
第二章 植物组织培养实验室的规划和建设	7
第一节 植物组织培养实验室的设计	7
一、植物组织培养实验室的设计原则	7
二、植物组织培养实验室的组成与设计要求	7
三、植物组织培养实验室设计实例	9
第二节 植物组织培养实验室的仪器设备及用品	12
一、基本仪器设备	12
二、玻璃器皿及用具	14
第三章 植物组织培养常用的培养基及配方	16
第一节 培养基的组成及其作用	16
一、无机营养	16
二、有机营养成分	17
三、植物生长调节剂	17
四、碳水化合物	18
五、固化剂	19
六、其他添加物	19
第二节 培养基的种类与配制	20
一、培养基的种类	20
二、培养基的配制	29
第四章 植物组织培养的操作技术	31
第一节 无菌操作	31
一、环境消毒与培养基灭菌	31
二、外植体的消毒	32
三、接种操作	34
四、试管苗的移栽与管理技术	34

第二节 植物组织培养的环境条件与培养程序	35
一、植物离体生长的环境条件	35
二、植物组织培养的程序	37
第五章 果树组织培养技术	41
第一节 愈伤组织培养	41
一、概述	41
二、愈伤组织诱导	41
三、愈伤组织的生理生化特性和遗传稳定性	43
四、愈伤组织的形成和形态	43
五、胚性愈伤组织的继代和保存	44
六、胚性愈伤组织在果树上的应用	44
第二节 细胞悬浮培养	45
一、细胞分离方法	46
二、初始悬浮细胞系的培养	46
三、细胞悬浮培养的方法	47
四、细胞悬浮培养基	49
五、悬浮培养的影响因素	49
六、悬浮细胞的同步化	50
七、悬浮培养细胞生长计量	50
八、细胞活力的测定	51
九、细胞悬浮培养的主要应用	51
第三节 茎尖培养	52
一、茎尖培养的意义	53
二、茎尖培养的主要应用及方法	54
三、茎尖培养技术在果树离体保存和育种上的应用	56
四、影响茎尖培养的因素	57
第四节 胚胎培养	59
一、胚胎培养的概念和意义	59
二、离体胚的培养	59
三、胚乳培养	63
第五节 花药培养	66
一、花药培养概述	66
二、花药培养技术	67
三、花药培养中的影响因素	67
四、花药培养的方式	69
五、单倍体植株的鉴定	69
六、花药植株的移栽和加倍	70
第六节 原生质体培养和体细胞杂交	70
一、果树原生质体研究的历史和现状	70
二、原生质体的分离和培养	71

三、体细胞杂交	74
四、原生质体操作的应用	76
第七节 种质离体保存	76
一、常温保存	77
二、低温保存	78
三、超低温保存	79
四、种质材料保存中存在的变异	81
五、体细胞无性系的检测	81
六、果树离体保存的主要步骤	82
七、果树种质离体保存的研究进展	82
第六章 果树病毒病的发生与危害	84
第一节 我国果树病毒病的发生现状	84
一、果树病毒病的主要种类与分类	84
二、果树病毒病的发生特点	89
第二节 果树病毒的危害性	90
一、非潜隐病毒的危害	90
二、潜隐病毒的危害	91
第三节 果树病毒类病害的病原	93
一、病毒	94
二、类病毒	99
三、植原体和螺原体	100
四、难培养细菌（类细菌）	102
第七章 果树病毒鉴定及检测技术	105
第一节 生物学鉴定	105
一、草本指示植物鉴定	105
二、木本指示植物鉴定	106
第二节 血清学检测	108
一、植物病毒抗血清制备	108
二、常用血清学检测方法	110
第三节 分子生物学检测	112
一、核酸分析	112
二、核酸杂交技术	115
第八章 果树病毒脱除技术	117
第一节 热处理脱病毒	117
一、高温空气处理装置	117
二、热处理条件	118
三、嫩梢嫁接	118
第二节 茎尖培养脱病毒	119
一、茎尖培养脱病毒的基本程序	119
二、茎尖大小与脱病毒的关系	119

第三节 热处理与茎尖培养相结合脱病毒	121
第四节 微芽嫁接脱病毒	121
一、微芽嫁接的基本程序	122
二、影响微芽嫁接成活的因素	123
第五节 化学处理脱病毒	123
第六节 抗病毒果树基因工程	124
一、外壳蛋白基因策略	124
二、病毒卫星 RNA 基因策略	124
三、运动蛋白基因策略	124
第九章 果树无病毒种苗的生产及管理	126
第一节 无病毒母本树和苗木的检疫管理	126
一、美国的母本树检疫制度	126
二、日本无病毒母本树检疫制度	129
第二节 无病毒果树种苗生产体系的建立	130
一、无病毒种苗生产体系的共同特点	130
二、无病毒种苗生产体系的结构与要求	131
第三节 我国无病毒果树种苗生产体系的建立和完善	132
一、柑橘无病毒苗的生产体系	132
二、苹果无病毒苗的生产体系	133
第四节 果树无病毒栽培的优越性	137
第十章 柑橘的脱毒与组织培养	140
第一节 柑橘无病毒良种繁育研究概况和重要性	140
一、柑橘无病毒良种繁育及工厂化育苗的重要性	140
二、国内外柑橘无病毒栽培的成就	140
三、柑橘工厂化育苗中存在的问题与展望	142
第二节 病毒病的种类及其危害	142
一、柑橘黄龙病	142
二、柑橘衰退病	143
三、柑橘裂皮病	143
四、柑橘碎叶病	144
五、温州蜜柑萎缩病	145
第三节 柑橘脱毒苗的生产技术	146
一、热处理获得无病毒苗木	146
二、化学处理获得无病毒苗木	147
三、珠心胚避毒获得无毒苗木	147
四、茎尖微芽嫁接脱毒	147
第四节 柑橘无病毒苗木的工厂化育苗程序	149
一、柑橘无病毒苗木繁育及工厂化育苗程序	149
二、无病毒苗木的鉴定	150
三、柑橘容器育苗	152

四、柑橘无病毒苗木的管理·····	153
第十一章 苹果的脱毒与组织培养 ·····	155
第一节 苹果无病毒苗木的繁育·····	155
一、嫁接繁殖·····	155
二、组培快繁·····	158
第二节 苹果无病毒苗木的栽培·····	161
一、品种和砧木的选择·····	161
二、高标准建园·····	163
三、土肥水管理·····	164
四、整形修剪及花果管理·····	165
五、病虫害综合防治·····	166
第十二章 梨的脱毒与组织培养 ·····	167
第一节 概述·····	167
一、我国梨生产概况·····	167
二、梨组培研究与应用进展·····	167
第二节 梨树病毒病的种类及其危害·····	169
一、概况·····	169
二、梨树主要病毒病及其危害·····	169
第三节 梨组培脱毒技术·····	173
一、梨病毒脱除技术·····	173
二、梨病毒检测技术·····	176
第四节 脱毒苗快繁技术·····	178
一、概述·····	178
二、组培快繁技术·····	178
第五节 脱毒苗的栽培技术·····	182
一、概述·····	182
二、栽培品种与砧木选择·····	183
三、无病毒梨树高产栽培技术要点·····	186
第十三章 葡萄的脱毒与组织培养 ·····	191
第一节 概述·····	191
一、国内外葡萄生产现状·····	191
二、葡萄脱毒组培快繁技术的研究与应用·····	191
三、葡萄无病毒化生产存在的问题与展望·····	192
第二节 葡萄病毒病与病毒检测技术·····	193
一、主要病毒病的种类、症状、为害和传播途径·····	194
二、病毒的检测与鉴定·····	197
三、病毒为害机理与防治·····	198
第三节 组培脱毒技术·····	199
一、葡萄脱毒原理·····	199
二、葡萄主要脱毒方法与技术·····	200

三、影响脱毒效果的因素·····	202
第四节 脱毒苗的组培快繁技术·····	203
一、脱毒苗试管快繁技术·····	203
二、葡萄试管苗工厂化育苗·····	207
第五节 葡萄脱毒苗的栽培技术·····	208
一、脱毒苗的生产优势·····	208
二、脱毒葡萄主要栽培技术要点·····	210
第十四章 草莓的脱毒与组织培养·····	212
第一节 草莓无病毒苗的繁育·····	212
一、匍匐茎繁殖法·····	212
二、组织快繁·····	212
三、草莓无病毒苗的生产工艺·····	213
第二节 草莓无病毒栽培·····	214
一、草莓的栽植·····	214
二、草莓的土壤管理·····	214
三、草莓的植株管理·····	214
第十五章 香蕉的脱毒与组织培养·····	216
第一节 香蕉脱毒快繁技术·····	216
一、培养基的配制·····	216
二、茎尖分离和接种·····	216
三、继代培养与诱导生根·····	217
四、移栽·····	218
第二节 香蕉脱毒苗的大田栽培·····	218
一、定植·····	218
二、栽培管理·····	219
第十六章 核果类果树的脱毒与组织培养·····	220
第一节 核果类果树无病毒苗的研究与生产现状·····	220
一、概况·····	220
二、桃潜隐花叶类病毒研究进展·····	220
第二节 核果类果树病毒病防治的发展趋势·····	222
附录1 中华人民共和国农业行业标准：苹果无病毒苗木（NY 329—1997）·····	223
附录2 中华人民共和国农业行业标准：苹果无病毒苗木繁育规程（NY/T 328—1997）·····	227
附录3 中华人民共和国国家标准：苹果无病毒母本树和苗木检疫规程（GB 12943—91）·····	231
附录4 中华人民共和国国家标准：柑橘苗木产地检疫规程（GB 5040—85）·····	235
参考文献·····	239

第一章 概述

植物组织培养技术的研究始于 20 世纪初期,最近二十几年来取得了引人瞩目的发展。一方面,组织培养的技术与方法已成为现代生物科学技术研究的一种有力工具,且由于近代细胞培养技术的不断完善,以及分子生物学、分子遗传学的发展,植物组织培养各方面的技术创新,突变体的选择和利用,原生质体杂交、基因转移,代谢物质生产以及植物基因库等研究不断广泛深入;另一方面,植物组织培养快速繁殖和培育无病毒苗木也正应用于商品性生产,逐步成为当今世界各国工农业生产的一种新的重要手段。果树组织培养的研究和应用从 20 世纪 70 年代以来,特别是最近十余年,取得了日新月异的进展。一些重要果树的组织培养获得成功,果树病毒检测、脱除技术取得较大的进展。在这一领域的研究和应用中,我国科技工作者作出了应有贡献。果树组织培养和工厂化育苗技术的研究和应用已受到我国各级果树主管部门和广大果农的普遍关注和高度重视,其发展前景十分广阔。

第一节 植物组织培养研究概况

一、植物组织培养的概念

在细胞学理论的基础上,人们试图应用无菌培养的方法来培养植物的一个离体部分,如器官、组织和细胞,包括茎尖、茎段、胚、子叶、胚珠、花瓣、花药、叶片及游离的细胞和去除细胞壁的原生质体等。这种培养是在人工控制条件下,研究其生长、发育、分化的规律,以及控制这些过程的条件和因素。通过长期的反复研究和实践,植物组织培养技术逐渐发展起来。植物组织培养技术是当今世界正在蓬勃兴起的生物工程技术,其实际应用价值日趋明显。目前已有多种作物特别是园艺作物,可以从感染病毒的植株重新得到无病毒植株,在生产上获得了显著的经济效益。通过茎尖培养加速了植物的繁殖速度,对优良品种的推广起到积极的促进作用。植物胚培养技术,对克服远缘杂交不孕、获得极早熟品种和新的杂种方面,已有多个成功的例子。植物花药培养技术已应用于育种实践,并且已有多种作物通过单倍体育种选育出新品种,在生产上显示出相当可观的经济效益和社会效益。

果树是木本植物中极其重要的经济作物,对发展国民经济和提高人民生活水平具有十分重要的作用。因此,近 20 年来果树组织培养技术发展十分迅速,研究内容越来越广泛,应用范围日趋扩大。不但在基础理论和应用基础理论上具有重要意义,而且在生产的实际应用和发展工农业生产上也显示出巨大的经济价值。果树虽然生长周期长,培养技术难度大,但在快速繁殖、脱除病毒及改良品种等方面,比一年生植物具有更特殊的意义。

二、植物组织培养原理

1. 植物细胞的全能性

德国植物学家哈伯兰德 (G. Haberlandt) 于 1902 年首次提出了植物细胞全能性的设想,当时限于技术条件和水平,培养未获成功。经过半个多世纪,从离体培养的细胞中再生