

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 2378—2013

葡萄苗木脱毒技术规范

Technical code for the elimination of viruses from grapevine nursery stock

2013-09-10 发布

2014-01-01 实施

中华人民共和国农业部 发布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由农业部种植业管理司提出。

本标准由全国果品标准化技术委员会(SAC/TC 510)归口。

本标准起草单位:中国农业科学院果树研究所、农业部果品及苗木质量监督检验测试中心(兴城)。

本标准主要起草人:董雅凤、张尊平、范旭东、任芳、刘凤之、聂继云。

葡萄苗木脱毒技术规范

1 范围

本标准规定了葡萄苗木脱毒的术语和定义,脱毒对象和脱毒方法。

本标准适用于葡萄加工品种、鲜食品种和砧木品种的脱毒。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件,其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。

NY/T 1843 葡萄无病毒母本树和苗木

NY/T 2377 葡萄病毒检测技术规范

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

葡萄苗木 *grapevine nursery stock*

采用接穗和砧木嫁接繁育的葡萄嫁接苗,以及通过扦插、组织培养等方法繁育的葡萄自根苗。

3.2

脱毒 *virus elimination*

采取一定的技术措施,从感染病毒的植株得到无病毒后代植株(不含有葡萄扇叶病毒、葡萄卷叶相关病毒 1、葡萄卷叶相关病毒 3、葡萄病毒 A 和葡萄斑点病毒)的过程。

3.3

茎尖培养 *shoot tip culture*

将嫩梢的生长点连同叶原基,大小约 0.2 cm~0.3 cm 的茎尖接种于试管内无菌培养基上,促其长成完整植株的过程。

3.4

葡萄试管苗 *grapevine plantlet in vitro*

指通过离体培养方法获得的无菌葡萄瓶苗。

3.5

热处理 *heat treatment*

将盆栽苗或试管苗置于恒温培养箱中,于 38℃ 恒温或 38℃ 与 32℃ 变温,每天光照 12 h~16 h 条件下生长,通过高温抑制病毒扩散,以获得无病毒茎尖的过程。

4 脱毒对象

4.1 葡萄扇叶病毒(*Grapevine fanleaf virus*, GFLV)。

4.2 葡萄卷叶相关病毒 1(*Grapevine leafroll-associated virus 1*, GLRaV-1)。

4.3 葡萄卷叶相关病毒 3(*Grapevine leafroll-associated virus 3*, GLRaV-3)。

4.4 葡萄病毒 A(*Grapevine virus A*, GVA)。

4.5 葡萄斑点病毒(*Grapevine fleck virus*, GFkV)。

4.6 其他病毒脱除参照本标准。

5 脱毒方法

5.1 器材

超净工作台、高压灭菌锅、光照培养箱、体视显微镜、pH 计、电磁炉、电冰箱、电子天平、消毒器、弯头镊子(25 cm)、解剖刀、解剖针、组织培养瓶、封口膜、培养皿、三角瓶等。

5.2 盆栽苗热处理

取待脱毒葡萄品种的盆栽苗置于温室中,苗木萌动发芽后,放入光照培养箱中。恒温热处理:在 $(38\pm 1)^{\circ}\text{C}$ 条件下处理 30 d~40 d。变温热处理: 32°C 和 38°C 每隔 8 h 变换一次,处理 60 d。每天光照 12 h 以上,光照强度为 5 000 lx~10 000 lx。处理结束后从该盆栽苗上剪取顶芽,进行茎尖培养,茎尖培养方法见 5.4。

5.3 试管苗热处理

待脱毒试管苗转接后,于 25°C ~ 28°C 继代培养 10 d~15 d,置恒温培养箱中(32°C)培养 1 周,然后升温至 $(38\pm 1)^{\circ}\text{C}$,每天光照 12 h 以上,光照强度 1 500 lx~2 000 lx,依据不同葡萄品种特性恒温热处理 30 d~40 d 或变温热处理(温度为 32°C 和 38°C 每隔 8 h 变换一次)60 d。为防止培养基干燥,热处理期间,可加入少量灭菌的 1/2 MS 培养基。热处理到期后,从试管苗上剥取 0.2 cm~0.3 cm 茎尖进行培养。

5.4 茎尖培养

5.4.1 培养基制备:采用 MS 基本培养基,添加植物生长调节剂、蔗糖、琼脂等,配制培养基的具体操作程序参见附录 A。

5.4.2 盆栽苗热处理后茎尖分离培养:从热处理到期的盆栽苗上,采集生长旺盛、长约 1 cm~2 cm 的顶梢,去掉叶片,在超净工作台上进行消毒处理。先用 75% 酒精浸泡 0.5 min,经蒸馏水冲洗后放入 0.1% 升汞中消毒 5 min~10 min,无菌水浸洗 3 次~5 次,取出后置于无菌培养皿上,在解剖镜下剥取 0.2 cm~0.3 cm 大小的茎尖,接种在分化增殖培养基上。

5.4.3 试管苗热处理后茎尖分离培养:从热处理到期的试管苗上取顶梢,在无菌培养皿上剥取 0.2 cm~0.3 cm 大小的茎尖,接种在分化增殖培养基上。

5.4.4 茎尖增殖:将接种的培养瓶置于 25°C ~ 28°C 、光照强度 1 000 lx~2 000 lx、每天光照时间 12 h 的组培室中培养。根据生长状况,每 1 个~2 个月转接 1 次,转接时,先将试管苗基部愈伤组织切除,再切成带 1 个腋芽的茎段,接种在增殖培养基上。由同一个茎尖增殖得到的组培苗为一个芽系,统一编号。继代 5 次~6 次,同一芽系的试管苗数量达到 5 瓶以上时,进行病毒检测。

5.4.5 病毒检测:茎尖培养获得的所有芽系均需进行病毒检测,以初步明确脱毒结果。具体检测方法见 NY/T 2377。

5.4.6 生根移栽:春季,经检测不带病毒的芽系,切取带 1 个芽的茎段,接种到生根培养基上,在组培室培养 1 个月后,将培养瓶置于智能温室或日光温室中,闭瓶炼苗 1 周~2 周。移栽前,在瓶中加少量水使培养基软化。移栽时,从瓶中取出幼苗,将试管苗根部附着的培养基洗干净,栽入装有基质(蛭石:草炭=1:1)的塑料营养钵中。试管苗移栽后,加盖塑料薄膜和遮阳网保湿、遮阴,保持空气相对湿度 80% 以上,温度控制在 20°C ~ 28°C 。

5.4.7 移栽试管苗病毒检测:翌年春季和秋季,从移栽成活的试管苗上采集嫩叶和休眠枝条进行病毒检测,具体检测方法见 NY/T 2377。

5.4.8 脱毒结果判定:根据试管苗和移栽成活苗的病毒检测结果判定脱毒结果,如未检测到本标准规定的脱毒对象,没有表现任何病毒病症状,且生长和结果性状符合该品种特性,则可以作为无病毒原种保存,为无病毒母本树和苗木繁育提供繁殖材料,具体要求参见 NY/T 1843。

附录 A
(资料性附录)
葡萄培养基制备

A.1 常用溶液配制

除特别说明外,均用蒸馏水溶解和定容,各种母液配完后,分别用玻璃瓶贮存,并且贴上标签,注明母液号、配制倍数和日期等,置 4℃ 冰箱保存。制备培养基用的母液和植物生长调节剂溶液配好后应尽快使用,保存期最好不超过 4 个月,如发现沉淀,则应丢弃。

A.1.1 MS 母液

I 号母液(溶解定容至 1 000 mL, 50×)

NH_4NO_3	82.5 g
KNO_3	95.0 g
KH_2PO_4	8.5 g

II 号母液(溶解定容至 500 mL, 100×)

H_3BO_3	310.0 mg
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	845 mg
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	430.0 mg
KI	41.5 mg
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	12.5 mg
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (62.5 mg/250 mL)	5 mL
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (62.5 mg/250 mL)	5 mL

III 号母液(溶解定容至 500 mL, 100×)

$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	22.0 g
---	--------

IV 号母液(溶解定容至 500 mL, 100×)

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	18.5 g
---	--------

V 号母液(溶解定容至 500 mL, 100×)

$\text{Na}_2\text{—EDTA}$	1.865 g
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1.39 g

VI 号母液(溶解定容至 500 mL, 100×)

肌醇(Myoinositol)	5.0 g
维生素 B ₆	25.0 mg
烟酸(Nicotinic acid)	25.0 mg
维生素 B ₁	5.0 mg
甘氨酸	100.0 mg

A.1.2 生长调节剂

一般配成 1 mg/10 mL 的贮存溶液, IAA、GA₃、IBA、NAA 等先用少量乙醇溶解, BA 先用少量 1 mol/L 盐酸溶解, 再加蒸馏水定容。

A.1.3 1.0 mol/L 盐酸和 1.0 mol/L NaOH(调整 pH 用)

1.0 mol/L HCl: 取 8.4 mL 浓 HCl, 定容至 100 mL。

1.0 mol/L NaOH:称 4 g NaOH 溶解后定容至 100 mL。

A.2 制备培养基

A.2.1 培养基种类

分化增殖培养基:1/2 MS(每 1 L 取 I 号母液 10 mL,取 II 号、III 号、IV 号、V 号、VI 号母液各 5 mL)附加 GA_3 0.1 mg/L~0.5 mg/L、IBA 0.1 mg/L~0.5 mg/L、BA 0.5 mg/L~1.0 mg/L、蔗糖 30 g/L、琼脂 5 g/L。

生根培养基:1/2MS(每 1 L 取 I 号母液 10 mL,取 II 号、III 号、IV 号、V 号、VI 号母液各 5 mL)附加 IBA 0.1 mg/L~0.3 mg/L(或 NAA 0.05 mg/L~0.2 mg/L、IAA 0.2 mg/L~0.5 mg/L)、蔗糖 15 g/L、琼脂 5 g/L。

A.2.2 培养基制备

A.2.2.1 根据所需培养基种类和数量依次吸取 I 号~VI 号母液,例如配 1/2 MS 培养基 2 L,则加入 I 号母液 20 mL,II 号~VI 号母液各 10 mL。

A.2.2.2 加入生长调节剂。例如,BA 的使用浓度为 1.0 mg/L,则配 2 L 培养基加入 20.0 mL 浓度为 1.0 mg/10 mL 的 BA 溶液。

A.2.2.3 加蒸馏水定容,充分混匀,用 1.0 mol/L 盐酸或 1.0 mol/L NaOH 调 pH 至 5.6~5.8。

A.2.2.4 稍加热,即放入琼脂,待其溶化后,加入蔗糖,充分搅拌溶解。

A.2.2.5 分装培养基。150 mL 的三角瓶,每瓶可装 40 mL~50 mL,1 L 培养基可灌 20 瓶~25 瓶。使用其他培养容器时,也应保持培养基的厚度为 1.0 cm~1.5 cm,以确保试管苗有足够的生长空间,且 1 个月~2 个月内培养基不干裂。

A.2.2.6 将三角瓶封口包扎后,放入高压灭菌锅内,121℃、1.1 kg/cm² 消毒 15 min~20 min。消毒完毕,放尽消毒锅中的热空气,立即取出平放,冷却后即可接种试管苗。

培养基制备好后,应尽快用完,若剩余,可置于冰箱冷藏室中黑暗保存(保存期不宜超过 2 周),以减缓营养物质和植物生长调节剂的分解。葡萄组培快繁时,培养基中激素的浓度和种类应根据品种和试管苗生长情况进行适度调整,以获得最佳效果。