

热处理对葡萄休眠枝条携带真菌脱除及萌芽和生根的影响

李艳美¹ 陈尚武² 张文¹ 马会勤^{1*}

(1. 中国农业大学 农学与生物技术学院, 北京 100193;

2. 中国农业大学 食品科学与工程学院, 北京 100083)

摘要 以来自北京的2个葡萄品种为材料,对插条内真菌的种类进行了检验,探索了通过热处理脱除插条中潜在病原真菌的方法,观察统计了不同温度和持续时间的水浴热处理对插条萌芽生根的影响。结果表明:从处于生理休眠期和环境休眠期的2个葡萄品种的4份插条样品中均检出了葡萄座腔菌属和链格孢属真菌,其他检出的主要真菌还包括:镰刀菌属和胶孢炭疽菌属真菌等。对葡萄插条进行40℃水浴0.5~5.0 h,不能达到脱菌的效果,60℃水浴0.5 h则会使葡萄插条的萌芽率降为0,50℃水浴,时间持续0.5~5.0 h均能将插条内的真菌完全脱除,这个处理条件对处于生理休眠期的插条,还具有明显提高萌芽率和生根率的作用,有利于冬季和早春葡萄提早育苗。研究结果为脱除葡萄插条中的潜在病原真菌,保证葡萄苗木起始材料的卫生健康,提供了可行的方法。

关键词 葡萄; 插条内真菌; 热处理; 萌芽; 生根

中图分类号 S 663.2

文章编号 1007-4333(2014)02-0074-07

文献标志码 A

Effect of hot water treatment on fungi eradication, germination and rooting in grape dormancy cuttings

LI Yan-mei¹, CHEN Shang-wu², ZHANG Wen¹, MA Hui-qin^{1*}

(1. College of Agronomy and Biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100193, China

2. College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China)

Abstract Grapevines are usually propagated by cuttings. The existence of pathogenic fungi *Botryosphaeria* in the cuttings is one of the main grapevine truck diseases in recent years. In this study, cuttings of two grape varieties collected from Beijing were used as materials in order to identify fungi in grape propagation materials. Temperature and time duration combinations were tested for their potential pathogenic fungi eradication effect in cuttings. The germination and rooting rate of cuttings after the treatments were recorded. Our results demonstrated that both *Botryosphaeria* and *Alternaria* were isolated from four batches of cuttings, in which two were at physiological dormancy and two at environmental dormancy. Other pathogenic fungi such as *Fusarium* and *colletotrichum* were identified from one or more batches of cuttings. Hot water treatment for 0.5 – 5.0 hours at 40 °C could not eradicate fungi in the cuttings. However, hot water treatment for 0.5 hour at 60 °C killed all the buds. When the cuttings were treated for 0.5 – 5.0 hours at 50 °C, the fungi in the cuttings were totally eradicated. These treatments improved the germination and rooting rate of the cuttings at physiological dormancy, which was beneficial in winter and early spring grapevine propagation. Our research provided with an effective method for potential pathogenic fungi eradication and nurseries for producing healthy starting material in vineyards.

Key words grapevine; fungi inside the cuttings; hot water treatment; germination rate, rooting rate

收稿日期: 2013-06-30

基金项目: 国家自然科学基金项目(31171939)

第一作者: 李艳美, 硕士研究生, E-mail: yanmeili2000@gmail.com

通讯作者: 马会勤, 教授, 主要从事葡萄研究, E-mail: dehlina@gmail.com

葡萄长期采用扦插繁殖和枝接, 2种无性繁殖的方法都容易造成枝干病害病原菌随着繁殖材料而迁移和扩散。目前由座腔菌属真菌导致的葡萄溃疡病已经成为葡萄健康和生产的严重威胁。在国内, 自2009年葡萄溃疡病在浙江被发现报道造成严重损失以来, 随后又在江苏、山西、广西、北京和湖南等其他省份被发现, 成为中国葡萄生产的重大障碍^[1]。调查也发现, 溃疡病不仅对各地葡萄园区造成了严重的损害, 而且在生产葡萄苗木的砧木材料和接穗圃中也有明显发生^[2]。造成葡萄溃疡病的座腔菌属真菌侵害葡萄枝干的木质部, 常处于潜伏状态, 在症状轻微的情况下, 表面的病症和表皮细胞的增生也很容易被忽略, 造成受到溃疡病菌污染的枝条作为插条或接穗用于新葡萄园的建园, 在有利病害发生的环境条件和管理低下的情况下, 很快导致溃疡病的发生, 造成重大损失。防治葡萄溃疡病等病害, 除了栽培期间的植保措施外, 保证起始育苗材料的健康是减少溃疡病等葡萄干部病害发生的基础。

热处理是常用的杀菌手段, 选用不同的温度和处理时间可以杀灭微生物, 保持食品的品质和植物材料的存活。食品科学领域巴氏灭菌可将待灭菌的材料加热到63~66℃, 保持30 min^[3]; 在组培领域, 也常用茎尖培养与茎尖热处理10~15 d(昼37℃ 8 h, 夜22℃ 16 h)相结合^[4], 来脱除葡萄的卷叶病毒和扇叶病毒等, 获得无毒苗; 在果品贮藏保鲜领域对果实60℃热水喷淋30 s或53℃浸泡2 min^[5], 都可以降低冷害指数, 延长果品贮藏时间。国外研究表明, 热处理可以有效脱除葡萄组织内的常见病原真菌和内生真菌, 其中50℃处理效果最优^[6]。本研究针对我国溃疡病发生的情况, 以找出可用于葡萄苗圃场中插条内真菌脱除的方法为目标, 探索不同水浴温度和处理时间对葡萄插条内真菌的脱除效果, 确定最优的处理条件, 可以保证葡萄育苗材料的健康, 减少葡萄枝干病害的发生。对葡萄生产具有重要的意义。

1 材料与方 法

1.1 材 料

分别在生理休眠期和环境休眠期采集设施和露地栽培的葡萄枝条材料, 取自北京的3个果园。设施葡萄插条采自日光温室, 采样时间分别为2012年12月28日和3月2日, 品种为保尔加尔(Bougal)。露地埋藏的插条的取样时间分别为2013年1月5日

和3月9日, 品种为王妃无核(Principem seedless)。

保尔加尔在生理休眠期所处小环境温度约为0℃或略低, 环境休眠期插条约为10℃或略高。预处理: 取材当天枝条剪成30 cm左右, 在室温下自来水中浸泡过夜, 第2天分组做下步处理。王妃无核从沙藏坑中刨出, 所处环境温度均为零下, 处于冻结状态。预处理同取自设施的插条。

1.2 方 法

1.2.1 葡萄插条内真菌的检测

葡萄插条内真菌的检测按照常规方法^[7]进行。随机选取对照插条, 将插条剪成约2~3 cm的小段, 流水冲洗表面, 洗衣粉洗涤15 min, 流水冲洗干净后, 在超净工作台上进行表面消毒: 75%乙醇30 s, 2% NaClO 1 min, 分2次进行, 间隔30 s, 中间用无菌水洗涤3次, 再次75%乙醇处理30 s, 用无菌水洗涤3次, 在无菌的滤纸上吸干水分后, 用无菌的枝剪剪成厚度1~3 mm的圆片, 转移至PDA培养基上, 每个培养皿中接种3~4片插条圆片。以对插条表面进行最后一次洗涤的无菌水涂布PDA培养基为对照。培养皿在26℃恒温培养箱中暗培养, 每24 h拍照记录。在真菌长至能分辨出差别后, 挑取代表性菌落边缘部位的菌丝进行转皿培养, 做分离和纯化。

纯化菌株DNA的提取采用改良的CTAB法^[8], 用1%琼脂糖凝胶电泳检测DNA产物, DNA提取样品置于-20℃冰箱保存备用。PCR扩增真菌rDNA-ITS区域, 利用通用引物ITS-1和ITS-4(上海英俊生物工程公司合成), 其序列分别为ITS-1(5'-CTTGGTCATTTTAGAGGAAGTAA-3')、ITS-4(5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')。反应程序为: 94℃, 5 min; 94℃, 40 s; 54℃, 40 s; 72℃, 40 s; 72℃, 7 min, 35个循环。PCR产物测序(上海三博远志生物工程技术服务有限公司)后, 利用美国国家生物技术信息中心(NCBI)核酸数据库中的BLAST(Basic local alignment search tool)工具, 比对分析序列相似性, 初步鉴定各菌株的属。

1.2.2 除菌处理

除菌处理包括热处理、农药浸泡, 以不做处理为对照。

热处理: 考虑到苗圃进行插条恒温水浴热处理时, 对温度和处理时间控制的可操作性, 本试验设计了40、50和60℃3个温度梯度, 热处理时间分别为0.25、0.50、1、2.50和5.00 h。将插条浸没于恒温

水浴中,每个处理各50个休眠芽,重复3次,水浴完成后迅速取出,待自然凉至室温后,按照葡萄单芽扦插的标准方法剪成单芽,上剪口为平口,距冬芽2~3 cm,下剪口为斜口,距冬芽3~4 cm,然后进行水培。定期统计萌芽数,并随机选取水培插条,按照1.2.1的方法,检测热处理对插条内真菌的脱除效果。

农药浸泡:分别采用生产中常用的多菌灵、戊唑醇和甲基硫菌灵3种农药,按照说明书推荐浓度将50根葡萄插条浸泡于杀菌剂溶液中室温24 h,按照1.2.1的方法,进行表面消毒后,将枝条圆片转移到PDA培养基上,检验杀菌剂浸泡处理对葡萄插条内部真菌的杀除效果。

1.2.3 插条萌芽率、生根率及氧化还原水平的检测

观察水培插条,以在芽鳞片处可观察到绿色组织为萌芽标准^[9],定期统计萌芽数,并观察记录新梢生长的情况。水培一定时间后,统计插条的生根情况,计算生根率。为检验热处理对葡萄插条组织氧化还原水平的影响,按照 Thordal-Christensen 等的方法在50℃水浴0.5 h后1、7和14 d取插条进行二氨基联苯胺(Diaminobenzidine, DAB)染色^[10],置于奥林巴斯体视显微镜(SZX16-Olympas)下观察染色的深度。

1.2.4 热处理后插条表面的扫描电镜观察

为了解热处理后葡萄插条表面可能出现的变化,插条经50℃水浴0.5 h后,分别自然冷却和冷水浸泡30 min冷却,以未经热处理的插条放入冷水中浸泡30 min,取出后自然晾干为对照^[11]。用切片刀切取0.5 cm长的正方形表皮,放于准备好的固定液中,依次进行固定、脱水、干燥、粘样和样品导电处理^[12]。用日立TM3000台式扫描电镜观察,比较插条表面特征的差异。

2 结果与分析

2.1 葡萄插条内的真菌检测

对照组插条圆片暗培养1~2 d后开始观察到真菌的生长,5 d后进行菌丝转皿、纯化得到不同菌株,而以最后一次洗涤插条的蒸馏水涂布PDA培养基的对照,5 d后没有出现任何真菌的生长,说明从插条圆片上分离得到的真菌均是生长在插条内部的真菌。从4组对照材料共160个枝条圆片中,得到120株真菌,根据菌落生长方式和颜色等形态学特征进行分类,共分成5个类型,取各类型的典型菌

株提取DNA,经PCR扩增ITS序列后,测序并进行序列比对分析,鉴定出曲霉属(*Aspergillus*)、链格孢属(*Alternariaare*)、胶孢炭疽菌属(*Colletotrichum*)、座腔菌属(*Botryosphaeria*)、镰刀菌属(*Fusarium*)等,其中全部供试材料中都分离得到链格孢属和座腔菌属。不同材料中分离得到的真菌类型及比例如表1。该试验结果与匡柳青等^[2]从来自云南和北京的2个葡萄园的枝干材料中分离得到的真菌类型相似。

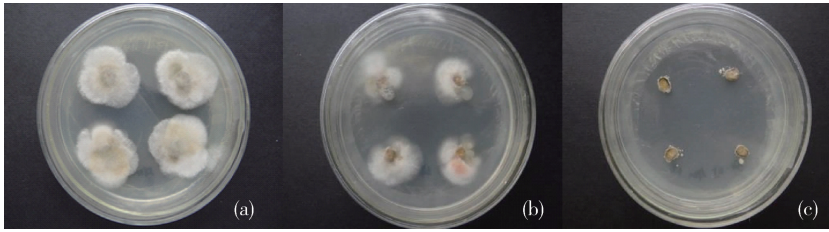
表1 不同插条材料分离到真菌的比例
Table 1 Proportion of the fungi isolated from different grapevine cuttings %

属	生理休眠期 Physiological dormancy		环境休眠期 Environmental dormancy	
	保尔加尔 Boulgal	王妃无核 Principem seedless	保尔加尔 Boulgal	王妃无核 Principem seedless
	曲霉属 <i>Aspergillus</i>	9.76	0	0
链格孢属 <i>Alternariaare</i>	68.29	31.43	60.00	37.50
胶孢炭疽菌属 <i>Colletotrichum</i>	7.32	0	0	0
座腔菌属 <i>Botryosphaeria</i>	14.63	21.90	25.00	45.00
镰刀菌属 <i>Fusarium</i>	0	46.67	15.00	5.00

2.2 不同杀菌处理对内生菌杀除效果

插条在水浴热处理后,实验室自然冷却至室温,随机选取5根插条表面消毒,每个处理各做5个皿,每个皿4个枝条圆片,于26℃恒温培养箱中暗培养,每24 h观察一次是否有真菌的生长。

不同温度和时间的热处理,对葡萄插条内的真菌脱除表现了明显不同的效果。40℃热处理0.5、1.0、2.5和5.0 h的插条材料,转移至培养基后1~2 d,均在培养基上观察到真菌的生长(图1(b))。50℃热处理0.5、1.0、2.5、5.0 h,10 d后均未观察到真菌的生长(图1(c));而50℃热处理0.25 h,在暗培养1~2 d观察到真菌的生长;40℃热处理的4个处理时长和50℃热处理0.25 h生长的真菌菌落大小和真菌类型差别不明显。以上结果表明,50℃大于0.5 h(包括0.5 h)的热处理可以实现对插条内真菌的脱除。



(a)对照组圆片培养 5 d 后 (b)40 °C 热处理 5 h 圆片培养后 2 d (c)50 °C 热处理 0.5 h 圆片培养 10 d 后
 (a)Five days after cultured of control cutting discs; (b)Two days after cultured of cutting discs treated in 40 °C water bath for 5 h;(c)Ten days after cultured of cutting discs treated in 50 °C water bath for 0.5 h

图 1 不同条件下葡萄插条内真菌情况

Fig.1 Fungal status under different conditions in grapevine cutting

为检测热处理后插条在较长时间内的真菌存在情况,对经不同时长 50 °C 热处理的插条分别在处理后 10、20 及 60 d 取样,检测结果如表 2。

表 2 50 °C 条件下不同时长的水浴热处理对葡萄插条内真菌的脱除效果

Table 2 Fungi eradication effect of grapevine cuttings treated in 50 °C water bath with different duration

热处理时长/h Hot water treat length	检测时间 Detection time		
	10 DAT	20 DAT	60 DAT
0.25	√	√	√
0.5	×	×	×
1.0	×	×	×
2.5	×	×	×
5.0	×	×	×

注:DAT,处理后时间(Days after treatment);√,PDA 培养基上有真菌生长;×,PDA 培养基上无真菌生长。

Note: DAT, Days after treatment; √, Fungus grow on PDA medium; ×, PDA medium.

以上结果表明,经 50 °C 热处理 0.5 h 及以上的插条,在育苗出圃时仍能保持可培养真菌为 0 的状态。

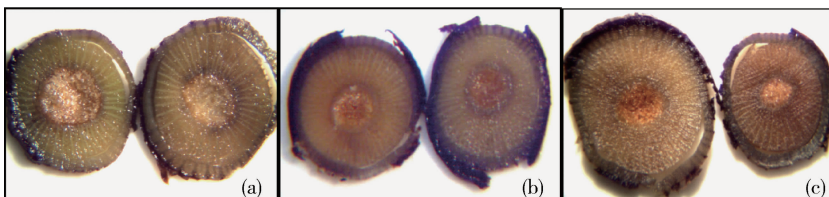
采用杀菌剂溶液浸泡插条是葡萄扦插育苗中常用的一种处理方法,试验结果表明无论是多菌灵 2 000

倍液,还是戊唑醇 2 000 和 3 000 倍液,以及甲基硫菌灵 1 000 倍液浸泡插条 24 h,都未起到对插条内真菌的抑制或杀灭作用。插条表面消毒后圆片培养,均于培养 1~2 d 后,在 PDA 培养基上观察到真菌的生长,真菌的类型和生长速度与未经任何处理的对照没有明显区别。

2.3 热处理后插条的生理状态

热处理在杀死插条内微生物的同时,也可能对枝条本身或冬芽造成伤害,热胁迫是植物常遇到的温度胁迫之一^[13-14]。植物在不同的发育时期和生理状态下,耐受胁迫的能力也不同,处于休眠期的葡萄枝条,比在活跃生长期对各种胁迫具有更强的耐受能力^[15]。年生长周期中,葡萄的休眠可以分为生理休眠和环境休眠 2 个阶段,在生理休眠期,即使给予适宜的环境条件,葡萄也不会萌芽。累积足够的需冷量,度过生理休眠期,是影响葡萄提早扦插或嫁接育苗的主要因素^[16]。

葡萄插条 50 °C 热处理 0.5 h 后,分别于处理后 1、7 和 14 d 对插条截面进行 DAB 染色,结果如图 2,图片左侧为经 50 °C 0.5 h 热处理的插条圆片,右侧为对照圆片。从染色结果可以看出,处理与对照插条的氧化还原水平相近,未发现热处理造成插条细胞氧化信号的爆发。



(a)处理后 1 d;(b)处理后 7 d;(c)处理后 14 d;左侧为处理,右侧为对照。

(a) 1 DAT; (b) 7 DAT; (c) 14 DAT; Discs from the treated cuttings are on the leaf, discs from the control cuttings are on the right.

图 2 葡萄插条经 50 °C 及 0.5 h 热处理与对照不同时间后 DAB 染色对比

Fig.2 Comparison of DAB stain of grapevine cutting discs after 0.5 h 50 °C water bath

处于生理休眠期和环境休眠期的葡萄插条经 60 °C 热处理 0.5 和 1.0 h 后, 2 个品种的芽全部死亡。处于生理休眠期的葡萄插条经 50 °C 热处理 1.0、2.5 和 5.0 h 处理后, 能使插条萌芽提前 5 d 左右, 萌芽率也显著提高, 3 种处理效果相近, 其中 5.0 h 稍高于其他处理时间(图 3(a))。环境休眠期插条经 50 °C 热处理 0.5、1.0 和 2.5 h 和对照组萌芽率基本一致, 1.0 h 热处理的萌芽情况最好, 而 5.0 h 萌芽率最低(图 3(b))。国外有通过热处理打破葡萄冬芽休眠的报道^[7,15], 试验结果表明葡萄插条所处的休眠期不同, 冬芽忍耐热胁迫的能力可能存在一定的不同。

葡萄插条在热处理后水培, 50 d 后插条生根率如表 3。由表 3 可以看出, 不同处理条件下插条的生根率在 5% 和 1% 水平差异显著。生理休眠期对照组的插条生根率低于 50%, 这与插条萌芽率低是同一个原因, 50 °C 热处理后插条生根状态正常, 且 1.0~2.5 h 的热处理能显著提高插条的生根率, 而 40 °C 热处理对插条生根无促进作用。环境休眠期的插条 50 °C 热处理后, 除 5.0 h 处理的生根率低于生产要求外, 其他各处理的插条生根率都较高, 能满足商业化育苗的要求, 50 °C 热处理 5.0 h 后扦插生根率明显降低可能与长时间的热胁迫有关。

表 3 不同温度和时间热处理后葡萄插条的生根率

Table 3 Rooting rate of grapevine cuttings after different temperature and length hot water bath

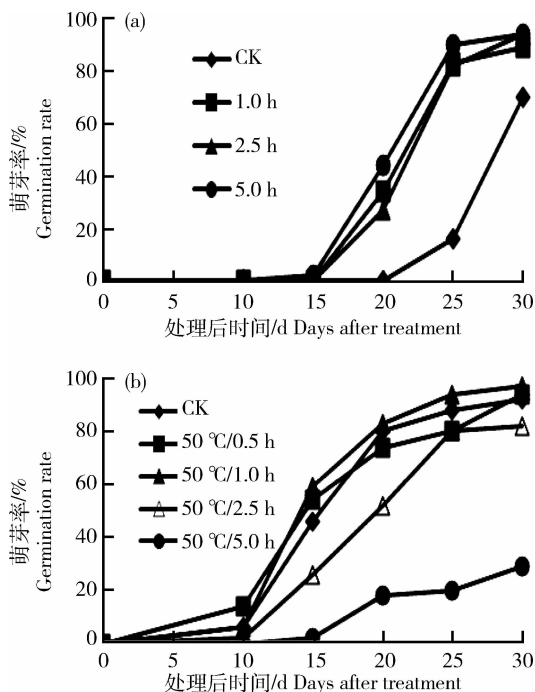
处理温度及时间 Treatment temperature and length	生理休眠期插条/% Cuttings in physiological dormancy	环境休眠期插条/% Cuttings in environment dormancy
对照 Control	40.20±1.02cC	92.10±1.32abAB
40 °C/0.50 h	36.00±1.05 dC	80.25±1.21 eD
40 °C/1.00 h	25.05±1.23 fgE	85.35±1.31 cC
40 °C/2.50 h	23.30±2.11 gE	93.00±1.67 aAB
40 °C/5.00 h	24.00±1.56 fgE	89.90±2.01 bB
50 °C/0.25 h	18.35±1.35 hF	84.00±1.21 cC
50 °C/0.50 h	29.80±1.33 eD	84.33±1.37 cdC
50 °C/1.00 h	55.30±1.52 bB	94.25±1.24 aA
50 °C/2.50 h	67.33±1.54 aA	81.90±1.09 deCD
50 °C/5.00 h	25.95±1.35 fE	65.40±2.31 fE

注: 不同大、小写字母分别表示数据在 1% 和 5% 的水平下显著差异。

Note: Different capital and small letters indicate the significant difference level at 0.01 and 0.05.

2.4 热处理对葡萄插条表面结构的影响

葡萄枝条的表面覆盖着角质和蜡质层, 对表皮细胞起保护作用。前人的研究表明, 果实表面进行热处



(a) 生理休眠期插条; (b) 环境休眠期插条

(a) Cuttings in physiological dormancy;

(b) Cutting in environmental dormancy

图 3 不同时长 50 °C 热处理葡萄插条的萌芽率

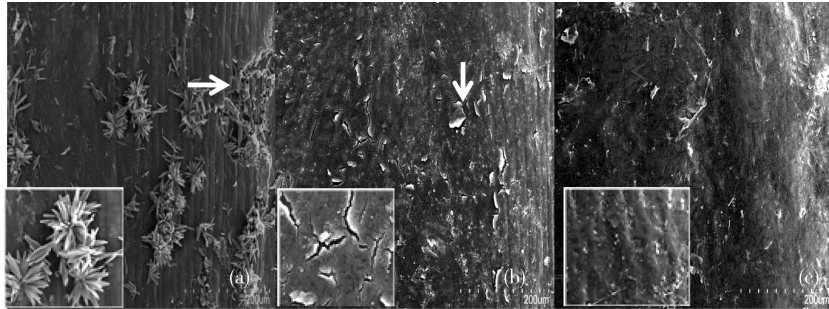
Fig. 3 Bud breaking rate of grapevine cuttings after different length of 50 °C water bath

理后, 除清洁除菌的作用外, 还能减少果实表面角质层、蜡质层的裂口及果实在贮藏、运输中的病害^[17]。在规模化苗圃场中运用时, 也需要制定热处理后插条

的冷却方案,以尽可能保证处理效果和生产效率。

50 ℃热处理 0.5 h 后,插条分别采用冷水浸泡冷却和自然冷却 2 种处理,并与对照一起,利用扫描电镜观察插条的表面结构,结果如图 4。对照插条的表皮上存在较大的角质蜡质破损(箭头),还存在大量晶体状的分泌物(图 4(a)),这些分泌物在冷水中浸泡 30 min 不会被溶解。插条经 50 ℃热处理 0.5 h 后,表面的晶体状分泌物均被除去,蜡质层分

布显得更加均匀,大的角质和蜡质破损被弥合。自然冷却的处理枝条表面的蜡质层更加平滑(图 4(c)),而冷水中冷却处理的插条,蜡质层出现小的破裂并翘起(图 4(b)箭头),这些微小的裂口可能是突然的冷热交替造成的。枝条表面的角质层和蜡质层对枝条有一定的保护作用,完整的蜡质层有利于减少病菌对插条的侵染。热处理对插条其他方面的影响有待进一步研究。



(a)对照插条;(b)50 ℃热处理 0.5 h 后,冷水冷却;(c)50 ℃热处理 0.5 h 后,自然冷却。

(a)control cuttings;(b)cuttings cool down in cold water after 0.5 h 50 ℃ water bath;

(c)cuttings cool down naturally in room temperature after 0.5 h 50 ℃ water bath.

图 4 水浴热处理和不同冷却方式对葡萄插条表面形态的影响

Fig. 4 Morphology of grapevine cutting surface after hot water bath and different cool down treatments

3 讨论

过去的几十年中,世界葡萄主产区的枝干病害日益严重^[18],育苗材料的污染是造成葡萄园枝干病害发生的重要原因。在我国由葡萄座腔菌属引起的葡萄溃疡病已经成为威胁葡萄产业的主要病害之一^[19],由于座腔菌属真菌对葡萄枝干的侵染深达木质部,很难通过药剂处理对发病的田间植株进行挽救,只能剪除发病枝干或刨除整株葡萄,对葡萄产业造成严重的损失。2012 年在宁夏等地新栽植的葡萄园中,葡萄在幼苗期也有溃疡病发生,这是育苗材料不洁造成的。有效控制和减少葡萄插条和接穗中的葡萄座腔菌属及其他病原真菌的侵染,是提高苗木质量,保证葡萄园健康的基础。

本研究结果表明,在育苗之前对葡萄插条进行常规杀菌剂浸泡的方法无法抑制或杀灭插条内部的真菌,而对葡萄插条进行 0.5~1.0 h 的 50 ℃水浴热处理,不仅可以有效杀灭插条内的真菌,而且对处于生理休眠期的插条还具有打破休眠,提高萌芽率和生根率的作用。40 ℃水浴即使延长处理时间也不能实现脱除插条内真菌的目标,而 60 ℃的水浴处

理会造成冬芽的死亡。生产上,葡萄插条可以做 50 ℃水浴热处理 0.5~1.0 h(或是根据实际情况选择处理条件),自然晾干,起到除菌的作用。而进一步表面蘸蜡处理,保护枝条表面的角质和蜡质,可能也是值得推荐的处理方法。

致谢:感谢中国农业大学农学与生物技术学院吴学宏老师在本研究中所提供的大力帮助和技术指导。

参 考 文 献

- [1] Li X H, Yan J Y, Kong F F, et al. Botryosphaeria dothidea causing canker of grapevine newly reported in China [J]. Plant Pathology, 2010(59): 1170
- [2] 匡柳青,陈尚武,张文,等. 越冬前北京和云南葡萄溃疡病组织内相关真菌的鉴定[J]. 中国农业大学学报, 2013, 19(1): 102-109
- [3] 杨苏声,周俊初. 微生物生物学[M]. 北京:科学出版社, 2004
- [4] 陈耕耘. 广西罗城毛葡萄组织培养脱毒技术研究[D]. 广西:广西师范大学, 2006
- [5] Porat R, Pavoncello D, Peretz J, et al. Effects of various heat treatments on the induction of cold tolerance and on the postharvest qualities of 'Star Ruby' grapefruit [J]. Postharvest

- Biol Techno,2000,18:159-165
- [6] Zhao F X, Chen L H, Perl A, et al. Proteomic changes in grape embryogenic callus in response to *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation[J]. Plant Sci, 2011(181):485-495
- [7] Van-Niekerk J M, Crous P W, Groenewald J Z, et al. DNA phylogeny, morphology and pathogenicity of *Botryosphaeria* species on grapevines[J]. Mycologia, 2004, 96(4):781-798
- [8] 易润华, 朱西儒, 周而勋. 简化 CTAB 法快速微量提取丝状真菌 DNA[J]. 湛江海洋大学学报, 2003, 23(6):72-73
- [9] Halaly T, Pang X Q, Batikoff T, et al. Similar mechanisms might be triggered by alternative external stimuli that induce dormancy release in grape buds[J]. Planta, 2008, 228:79-88
- [10] Thordal-Christensen H, Zhang Z G, Wei Y D, et al. Subcellular location of H₂O₂ in plants H₂O₂ accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley-powdery mildew interaction[J]. Plant J, 1997, 11(6):1187-194
- [11] Crous P W, Swart L, Coertze S. The effect of hot-water treatment on fungi occurring in apparently healthy grapevine cuttings[J]. Phytopathol Mediterr, 2001, 40(S):464-466
- [12] Hu H Q, Hu X Y, Sun Y. SEM sample preparation for leaf epidermis of *Castanopsis fargesii*. [J]. Guihaia, 2012, 32(1):53-55
- [13] Zhang J H, Wang L J, Pan Q H, et al. Accumulation and subcellular localization of heat shock proteins in young grape leaves during cross-adaptation to temperature stresses[J]. Sci Hort, 2008(117):231-240
- [14] Zhang J H, Huang W D, Pan Q H, et al. Improvement of chilling tolerance and accumulation of heat shock proteins in grape berries (*Vitis vinifera* cv. Jingxiu) by heat pretreatment [J]. Postharvest Biol Techno, 2005(38):80-90
- [15] Waite H, Morton L. Hot water treatment, trunk diseases and other critical factors in the production of high-quality grapevine planting material[J]. Phytopathol Mediterr, 2007(46):5-17
- [16] Coombe B G. Adoption of a system for identifying grapevine growth stages[J]. Aust J Grape Wine R, 1995(1):100-110
- [17] Schirra M, Ben-Yehoshua S, Fallik E, et al. Host-pathogen interactions modulated by heat treatment[J]. Postharvest Biol Techno, 2000, 21:71-85
- [18] Bertsch C, Magnin-Robert M, Larignon P, et al. Grapevine trunk diseases: Complex and still poorly understood[J]. Plant Pathology, 2012, 10(1111):1365-3059
- [19] Yan J Y, Peng Y L, Xie Y, et al. First report of grapevine trunk disease caused by *Botryosphaeria obtusa* in China [J]. Plant Dis, 2011, 95(5):616

责任编辑:王燕华