

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 973—2006

柑橘无病毒苗木繁育规程

Criteria for the propagation of citrus virus-free budling

2006-01-26 发布

2006-04-01 实施



中华人民共和国农业部 发布

前 言

本标准的附录 A 和 B 为规范性附录,附录 C 为资料性附录。

本标准由中华人民共和国农业部提出并归口。

本标准起草单位:农业部柑橘及苗木质量监督检验测试中心、中国农业科学院柑橘研究所、四川省农业厅植物检疫站、湖南省农业厅经济作物局、重庆市农业局经济作物技术推广站和广东省农业科学院果树研究所。

本标准主要起草人:周常勇、赵学源、蒋元晖、戴胜根、唐科志、杨方云、李太盛、彭炜、丁伟民、吴正亮、唐小浪。

柑橘无病毒苗木繁育规程

1 范围

本标准规定了柑橘无病毒苗木繁育的术语和定义、要求、柑橘病毒病和类似病毒病害检测方法、脱毒技术以及无病毒母本园、无病毒采穗圃和无病毒苗圃的建立和管理。

本标准适用于全国柑橘产区的甜橙、宽皮柑橘、柚、葡萄柚、柠檬、来檬、枸橼(佛手)、酸橙和金柑以及以它们为亲本的杂交种的无病毒苗木的繁育。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件,其随后所有的修改单(不包括勘误的内容)或修订版均不适用于本标准,然而,鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件,其最新版本适用于本标准。

GB 5040 柑橘苗木产地检疫规程

GB 9659 柑橘嫁接苗分级及检验

3 术语和定义

3.1

适栽品种 commercial variety

适合于当地栽培的柑橘品种。

3.2

原始母树 original mother tree

对病毒病和类似病毒病害感染状况尚不明确的母本树。

3.3

病毒病和类似病毒病害 virus and virus-like diseases

由病毒、类病毒、植原体、螺原体和某些难培养细菌引起的植物病害。

3.4

指示植物 indicator plant

受某种病原物侵染后,能表现具有特征性症状的植物。

3.5

茎尖嫁接 shoot-tip grafting

将嫩梢顶端生长点连同2~3个叶原基,长度为0.14 mm~0.18 mm的茎尖嫁接于试管内生长的砧木的过程。

3.6

脱毒 virus exclusion

采用茎尖嫁接或热处理+茎尖嫁接方法,使已受病毒病和类似病毒病害感染的植株的无病毒部分与原植株脱离而得到无病毒植株的过程。

3.7

无病毒母本树 virus-free mother tree

用符合本规程要求的无病毒品种原始材料繁育或经检测符合本规程要求的无病毒的可供采穗用的

植株。

3.8

无病毒母本园 virus-free mother block

种植无病毒母本树的园地。

3.9

无病毒采穗圃 virus-free increasing block

用无病毒母本树的接穗繁殖的苗木建立的用于生产接穗的圃地。

3.10

无病毒苗圃 virus-free nursery

用从无病毒采穗圃或无病毒母本园采集的接穗繁殖苗木的圃地。

4 要求

4.1 接穗和砧木

4.1.1 繁殖柑橘无病毒苗木所用的接穗和砧木的品种都是适栽品种。

4.1.2 繁殖柑橘无病毒苗木所用的砧木用实生苗。

4.2 柑橘无病毒苗木不带有下述病毒病和类似病毒病害

4.2.1 国内已有品种的苗木不带黄龙病(huanglongbing)、裂皮病(exocortis)、碎叶病(tatter leaf),柑橘衰退病毒茎陷点型强毒系引起的柚矮化病(pummelo dwarf)和甜橙茎陷点病(sweet orange stem-pitting)以及温州蜜柑萎缩病(satsuma dwarf)。

4.2.2 从国外引进的柑橘苗木,除不带4.2.1所列病害外,还要求不带鳞皮病(psorosis)、木质陷孔病(cachexia)、石果病(impetratura)、顽固病(stubborn)、杂色褪绿病(variegated chlorosis)和来檬丛枝病(lime witches' broom)等各种病毒病和类似病毒病害。

4.3 柑橘无病毒苗木不带溃疡病

按 GB 5040 规定执行。

4.4 柑橘无病毒苗木的生长规格

嫁接口高度、干高、苗木高度、苗木径粗和根系生长按 GB 9659 规定执行。

5 原始母树的选定

5.1 适栽品种(单株系)名单由省级农业行政部门确定。

5.2 原始母树用适栽品种的优良单株,或具有该品种典型园艺学性状的其他单株。

6 原始母树感染病毒病和类似病毒病害情况鉴定

6.1 从原始母树采接穗,在用40目塑料网纱构建的网室内嫁接繁殖4株苗木,以备病毒病和类似病毒病鉴定和脱毒用。

6.2 病毒病和类似病毒病害鉴定可采用指示植物法(见本标准7和附录A),亦可采用快速法,后者包括血清学鉴定、聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定和分子生物学鉴定(见附录C)。

6.3 鉴定证明原始母树未感染本标准要求不得带有的病毒病和类似病毒病害,从该母树采接穗在网室内繁殖的苗木(同6.1),即系柑橘无病毒苗木,可用作柑橘无病毒品种原始材料。

6.4 鉴定证明原始母树已感染本标准要求不带的病毒病和类似病毒病害,该母树要进行脱毒。

7 指示植物鉴定

7.1 鉴定的病害,指示植物种类(品种),鉴别症状,适于发病的温度和鉴定一植株所需指示植物株数见

附录 A。

7.2 指示植物鉴定在用 40 目网纱构建的网室或温室内进行。

7.3 指示植物中, Etrog 香橼的亚利桑那 861 或 861-S-1 选系和凤凰袖用嫁接苗或扦插苗, 其他指示植物用实生苗或嫁接苗。

7.4 接种木本指示植物用嫁接接种, 一般用单芽或枝段腹接, 除黄龙病鉴定外, 亦可用皮接。接种草本指示植物用汁液摩擦接种。

7.5 在每一批鉴定中, 鉴定一种病害需设接种标准毒源的指示植物作正对照, 设不接种的指示植物作负对照。

7.6 指示植物接种时, 在一个品种材料接种后, 所用嫁接刀和修枝剪用 1% 次氯酸钠液消毒, 操作人员用肥皂洗手。

7.7 指示植物要加强肥水管理和病虫害防治, 以保持指示植物的健壮生长, 并及时修剪, 诱发新梢生长, 加速症状表现。

7.8 在适宜发病条件下, 每 3 d~10 d 观察一次发病情况, 在不易发病的季节, 每 2 周~4 周观察一次。

7.9 指示植物的发病情况, 一般观察到接种后 24 个月为止。观察期间, 如果正对照植株发病而负对照植株未发病, 可根据指示植物发病与否判断被鉴定植株是否带病。在鉴定某种病害的指示植物中有 1 株发病, 被鉴定的植株即判定为带病。

8 脱毒

8.1 脱毒技术

对已受裂皮病、木质陷孔病、顽固病、来檬丛枝病、杂色褪绿病或黄龙病感染的植株, 采用茎尖嫁接法脱毒; 对已受碎叶病、温州蜜柑萎缩病、衰退病、鳞皮病或石果病感染的植株, 采用热处理+茎尖嫁接法脱毒。

8.2 茎尖嫁接脱毒技术的操作

8.2.1 茎尖嫁接在无菌条件下操作。

8.2.2 砧木准备。常用枳橙或枳的种子。剥去内、外种皮, 经用 0.5% 次氯酸钠液(加 0.1% 吐温 20) 浸 10 min 后, 灭菌水洗 3 次, 播于经高压消毒的试管内 MS 固体培养基上, 在 27℃ 黑暗中生长, 两周后供嫁接用。

8.2.3 茎尖准备及嫁接。采 1 cm~2 cm 长的嫩梢, 经 0.25% 次氯酸钠液(加 0.1% 吐温 20) 浸 5 min, 灭菌水洗 3 次后切取顶端生长点连同其下 2 个~3 个叶原基, 长度为 0.14 mm~0.18 mm 的茎尖嫁接于砧木, 放入经高压消毒的装有 MS 液体培养基的试管中, 在生长箱或培养室内保持 27℃、每天 16 h、1000 Lux 光照和 8 h 黑暗条件下生长。

8.2.4 茎尖嫁接苗的移栽或再嫁接。试管内茎尖嫁接苗长出 3 个~4 个叶片时, 可移栽于盛有消毒土壤的盆中, 或将茎尖嫁接苗再嫁接于盆栽砧木上, 以加速生长。

8.2.5 脱毒效果的确认。从茎尖嫁接苗取枝条嫁接于指示植物, 或取样用快速鉴定法鉴定其感病情况, 如果呈阴性反应, 证明原始母树所带病原已经脱除。所需鉴定的病害种类与原始母树所感染的相同。

8.3 热处理+茎尖嫁接脱毒技术的操作

供脱毒的植株每天在 40℃ 有光照条件下生长 16 h 和在 30℃ 黑暗条件下生长 8 h, 连续 10 d~60 d 后采嫩梢进行茎尖嫁接, 其他步骤与 8.2 同。

9 柑橘无病毒品种原始材料的网室保存

9.1 网室用 40 目网纱构建, 网室内工具专用, 修枝剪在使用于每一植株前用 1% 次氯酸钠液消毒。工

作人员进入网室工作前,用肥皂洗手;操作时,人手避免与植株伤口接触。

9.2 每个品种材料的脱毒后代在网室保存2株~4株,用做柑橘无病毒品种原始材料。

9.3 网室保存的植株除有特殊要求的以外,采用枳作砧木。

9.4 网室保存植株用盆栽,盆高约30 cm,盆口直径约30 cm。

9.5 网室保存植株每年春梢萌发前重修剪一次,每隔5年~6年,通过嫁接繁殖更新。

9.6 网室保存植株每年调查一次黄龙病、柚矮化病和甜橙茎陷点病发生情况,每五年鉴定一次裂皮病、碎叶病、温州蜜柑萎缩病和鳞皮病感染情况。发现受感染植株,立即淘汰。

10 无病毒母本园的建立与管理

10.1 地点

10.1.1 在黄龙病发生区,柑橘无病毒母本园建立在由40目塑料纱网构建的网室内,或建立在与其他柑橘种植地的隔离状况符合GB 5040规定的田间。

10.1.2 在非黄龙病发生区,柑橘无病毒母本园建立在田间,用围墙或绿篱与其他柑橘种植地隔开。

10.2 无病毒母本树的种植株数

每个品种材料的无病毒母本树在无病毒母本园内种植2株~6株。

10.3 管理

10.3.1 无病毒母本树启用的时间

植株连续结果3年显示其品种固有的园艺学性状后,开始用做母本树。

10.3.2 柑橘无病毒母本树的病害调查、检测和品种纯正性观察以及处理方法。

10.3.2.1 每年10月~11月,调查黄龙病发生情况,调查病害的症状依据见附录B。

10.3.2.2 每年5月~6月,调查柚矮化病和甜橙茎陷点病发生情况,调查病害的症状依据见附录B。

10.3.2.3 每隔3年,应用指示植物或RT-PCR或血清学技术检测裂皮病、碎叶病和温州蜜柑萎缩病感染情况。

10.3.2.4 每年采果前,观察枝叶生长和果实形态,确定品种是否纯正。

10.3.2.5 经过病害调查、检测和品种纯正性观察,淘汰不符合本规程要求的植株。

10.3.3 用于柑橘无病毒母本树的常用工具专用,枝剪和刀、锯在使用于每株之前,用1%次氯酸钠液消毒。工作人员在进入柑橘无病毒母本园工作前,用肥皂洗手;操作时,人手避免与植株伤口接触。

11 无病毒采穗圃的建立与管理

11.1 地点

11.1.1 在黄龙病发生区,无病毒采穗圃建立在由40目塑料纱网构建的网室内,或建立在与其他柑橘种植地的隔离状况符合GB 5040规定的田间。

11.1.2 在非黄龙病发生区,无病毒采穗圃建立在田间,用围墙或绿篱与其他柑橘种植地隔开。

11.2 管理

11.2.1 繁殖无病毒采穗圃植株所用接穗全部采自无病毒母本园。

11.2.2 无病毒采穗圃植株可以采集接穗的时间,限于植株在采穗圃种植后的3年内。

11.2.3 用于柑橘无病毒采穗圃的常用工具专用,枝剪在使用于每个品种材料之前,用1%次氯酸钠液消毒。工作人员在进入柑橘无病毒采穗圃工作前,用肥皂洗手;操作时,人手避免与植株伤口接触。

11.2.4 每年5月~6月,调查柚矮化病和甜橙茎陷点病发生情况;10月~11月,调查黄龙病发生情况,调查病害的症状依据见附录B,调查中发现病株,立即挖除。

12 无病毒苗圃的建立与管理

12.1 地点

12.1.1 在黄龙病发生区,无病毒苗圃建立在由 40 目塑料纱网构建的网室内,或建立在与其他柑橘种植地的隔离状况符合 GB 5040 规定的田间。

12.1.2 在非黄龙病发生区,无病毒苗圃建立在田间,用围墙或绿篱与其他柑橘种植地隔开。

12.2 管理

12.2.1 繁殖苗木所用接穗全部来自无病毒采穗圃或无病毒母本园。

12.2.2 用于柑橘无病毒苗圃的常用工具专用,枝剪和嫁接刀在使用于每个品种材料之前,用 1% 次氯酸钠液消毒。工作人员在进入柑橘无病毒苗圃工作前,用肥皂洗手;操作时,人手避免与植株伤口接触。

12.2.3 苗木出圃前,调查黄龙病、柚矮化病和甜橙茎陷点病发生情况,调查病害的症状依据见附录 B,发现病株,立即拔除。

序号	名称	规格	单位	备注
1	塑料纱网	40目	m ²	
2	塑料薄膜	0.1mm厚	m ²	
3	木桩	10cm×10cm	m	
4	水泥柱	10cm×10cm	m	
5	铁线网	1.5m×1.5m	m ²	
6	木架	2m×2m	m ²	
7	木架	2m×2m	m ²	
8	木架	2m×2m	m ²	
9	木架	2m×2m	m ²	
10	木架	2m×2m	m ²	
11	木架	2m×2m	m ²	
12	木架	2m×2m	m ²	
13	木架	2m×2m	m ²	
14	木架	2m×2m	m ²	
15	木架	2m×2m	m ²	
16	木架	2m×2m	m ²	
17	木架	2m×2m	m ²	
18	木架	2m×2m	m ²	
19	木架	2m×2m	m ²	
20	木架	2m×2m	m ²	

附录 A

(规范性附录)

应用指示植物鉴定柑橘病毒病和类似病毒病害的标准参数

病 害	指示植物种类 (品种)	鉴别症状	适于发病的温度 (℃)	鉴定一植株所需 指示植物株数
裂皮病	Etrog 香橙的亚利桑那 861 或 861-S-1 选系	嫩叶严重向后卷	27~40	5
碎叶病	Rusk 枳橙	叶部黄斑、叶缘缺损	18~26	5
黄龙病	椪柑或甜橙	叶片斑驳型黄化	27~32	10
柚矮化病	凤凰柚	茎木质部严重陷点	18~26	5
甜橙茎陷点病	madam vinous 甜橙	茎木质部严重陷点	18~26	5
温州蜜柑萎缩病	白芝麻	叶部枯斑	18~26	10
鳞皮病	凤梨甜橙、madam vinous 甜橙、dweet 橘橙	叶脉斑纹,有时春季嫩梢 迅速枯萎(休克)	18~26	5
顽固病	madam vinous 甜橙	新叶小,叶尖黄化	27~38	10
木质陷孔病	用快速生长的砧木嫁接 的 parson 专用橘	嫁接口和第一次重剪后 分枝处充胶	27~40	5
石果病	dweet 橘橙、凤梨甜橙、 madam vinous 甜橙	橡叶症	18~26	5
来檬丛枝病	墨西哥来檬	芽异常萌发引起的枝叶 丛生	27~32	10
杂色褪绿病	伏令夏橙、哈姆林甜橙	叶正面褪绿斑,相应反面 褐色胶斑	27~32	10

附录 B
(规范性附录)

田间应用目测法诊断黄龙病、柚矮化病和甜橙茎陷点病的症状依据

病 害	症 状 依 据
黄龙病	叶片转绿后从叶脉附近和叶片基部开始褪绿,形成黄绿相间的斑驳型黄化 发病初期,树冠上部有部分新梢叶片黄化形成的“黄梢”
柚矮化病	小枝木质部陷点严重,春梢短、叶片扭曲
甜橙茎陷点病	小枝木质部陷点严重,小枝基部易折裂,叶片主脉黄化,果实变小

附录 C
(资料性附录)

应用快速法鉴定柑橘病毒病和类似病毒病害

方 法		病 害
血清学	A 蛋白酶联免疫吸附法	温州蜜柑萎缩病
	双抗体夹心酶联免疫吸附法	碎叶病、鳞皮病
双向聚丙烯酰胺凝胶电泳		裂皮病和木质陷孔病
分子生物学	多聚酶链式反应	黄龙病、来檬丛枝病和杂色褪绿病
	反转录多聚酶链式反应	裂皮病、木质陷孔病、衰退病和鳞皮病
	半巢式反转录多聚酶链式反应	碎叶病