

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 974—2006

柑橘苗木脱毒技术规范

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 是规范性附录、附录 B 和附录 C 是资料性附录。

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：中国农业科学院柑橘研究所、湖南农业大学、重庆市果树研究所、广西柑橘研究所和农业部柑橘及苗木质量监督检验测试中心。

本标准主要起草人：周常勇、蒋元晖、赵学源、唐科志、杨方云、李太盛、肖启明、李隆华、白先进。

柑橘苗木脱毒技术规范

1 范围

本标准规定了国内柑橘苗木的脱毒对象、脱毒技术、脱毒效果检测和质量要求。

本标准适用于甜橙、宽皮柑橘、柚、葡萄柚、柠檬、来檬、枸橼(佛手)、酸橙和金柑以及有关杂交种苗木的脱毒。

2 引用标准

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

3 术语和定义

3.1

柑橘苗木 citrus budling

指嫁接苗,接穗和砧木组合的苗木。

3.2

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。

3.3

脱毒 virus exclusion

采取一定的技术措施,从受病毒病或类似病毒病害感染的植株得到无病毒后代植株的过程。

3.4

茎尖嫁接 shoot-tip grafting

将嫩梢的生长点连同2个~3个叶原基,大小约0.14 mm~0.18 mm的茎尖嫁接于试管内生长的砧木上的过程。

3.5

指示植物 indicator plant

受某种病原物侵染后能敏感地表现具有特征性症状的植物。

4 脱毒对象

4.1 柑橘黄龙病病原细菌(*Candidatus Liberobacter asiaticus*)

4.2 柑橘裂皮病类病毒(*Citrus exocotis viroid*, CEV)

4.3 柑橘碎叶病毒(*Citrus tatter leaf virus*, CTLV)

4.4 柑橘衰退病毒(*Citrus tristeza virus*, CTV)引起柚矮化病和甜橙茎陷点病的株系。

4.5 温州蜜柑萎缩病毒(*Satsuma dwarf virus*, SDV)

5 脱毒技术

5.1 应用湿热空气处理脱除柑橘黄龙病

按 GB 5040 执行。

5.2 应用茎尖嫁接技术脱除柑橘黄龙病和柑橘裂皮病

5.2.1 器材

超净工作台、高压消毒锅、恒温箱、光照培养箱、高倍体视显微镜、酒精灯、镊子(长 25 cm 及 10 cm 各 1 把)、茎尖嫁接刀(自制,用宽约 6 mm 的竹片顶端夹住双面刀片的尖头碎片,用棉线捆牢)、试管(口径 25 mm,长 150 mm)及棉塞、培养皿(直径 10.5 cm 及 6.5 cm)和烧杯。

5.2.2 茎尖嫁接在无菌条件下操作

5.2.3 茎尖嫁接前用品准备

5.2.3.1 培养基

固体、液体 MS 培养基按附录 A 配方配制,装入试管,每管约 20 ml。试管在装入液体培养基前,需在管底放入滤纸桥(用约 9 cm 直径的圆形滤纸,中央剪 0.5 cm 见方的孔,摺成圆柱形,放入管内,孔朝上)用以支撑茎尖嫁接苗。滤纸桥高度与液体培养基的液面平。

5.2.3.2 操作垫纸

用白纸裁成 64 开大小,10 张成叠,外用 16 开纸包扎。

5.2.3.3 茎尖嫁接刀

将自制的茎尖嫁接刀 10 把~15 把扎成一捆放入试管内,刀尖朝下,悬空。管底垫少量棉花及纸以防刀尖接触管壁。管口用牛皮纸封住。

5.2.3.4 培养皿

每个用牛皮纸包被,打捆,或放入烧杯,用牛皮纸封口。

5.2.3.5 培养基和其他用品的消毒

将 5.2.3.1、5.2.3.2、5.2.3.3、5.2.3.4 各项用品放入高压消毒锅内消毒。消毒温度为 121℃,持续 20 min。其中,茎尖嫁接刀须用有套层的高压蒸汽消毒器消毒,以达到消毒物品干燥的要求,避免刀口生锈,影响嫁接成活。

5.2.4 砧木准备

砧木常用枳橙或枳的实生苗。剥去种子的内、外种皮,放入直径为 10.5 cm 的培养皿,用 0.5% 次氯酸钠液(加 0.1% 吐温 20)浸 10 min,无菌水洗 3 次,每次 1 min~2 min,播于试管内 MS 固体培养基上,每管 1 粒~3 粒,在 27℃ 黑暗中萌发、生长,两周后可供茎尖嫁接。如暂时不用,试管罩上塑料袋,直立放入 4℃~8℃ 冰箱内备用。

5.2.5 茎尖准备

采 1 cm~2 cm 长的健壮嫩梢,摘除下部较大叶片,放入直径为 6.5 cm 的培养皿,经 0.25% 次氯酸钠液(加 0.1% 吐温 20)浸 5 min,无菌水洗 3 次,每次 1 min~2 min,备用。

5.2.6 茎尖嫁接

高倍体视显微镜放超净台上,用棉球蘸消毒酒精擦手及台面,点燃酒精灯,将大、小镊子在灯上灼烧消毒;将操作垫纸放在双筒扩大镜镜台上,用镊子取出砧木苗(以选用直径 0.1 cm 以上的为好)放于纸上,截顶留 1.5 cm 茎,切去根尖留 4 cm~6 cm 根,去子叶和腋芽。在放大 10 倍的镜头下操作,在砧木顶侧开倒 T 形切口,横切一刀,竖切平行两刀,深达形成层,两刀间距以能放入茎尖为宜,挑去三刀间的皮层,形成 U 字形切口。取 5.2.5 准备好的梢段,切下生长点连带 2 个~3 个叶原基,长度为 0.14 mm~0.18 mm 的茎尖,放入切口,茎尖切面与砧木的横切面相贴。将茎尖嫁接苗放入盛有 MS 液体培养基的试管内。

5.2.7 茎尖嫁接苗管理

将装有茎尖嫁接苗的试管置于 26℃~27℃ 恒温下培养,每天光照 1 000 Lux 16 h,黑暗 8 h。

5.2.8 茎尖嫁接苗的再嫁接

待试管内茎尖嫁接苗长出2个~3个叶片稍老化时,将茎尖嫁接苗从试管内取出,切去根部,留长1 cm~1.5 cm 砧木的茎,削去一侧皮层,嫁接在网室内盆栽砧木倒砧口下侧顶部。上套聚乙烯薄膜袋保湿,成活后去袋,待再发新梢老化后截砧。

5.3 应用热处理+茎尖嫁接脱除柑橘碎叶病、温州蜜柑萎缩病和柑橘衰退病

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1 cm~2 cm进行茎尖嫁接。茎尖嫁接程序、茎尖嫁接苗管理及再嫁接与5.2相同。

6 脱毒效果检测

6.1 指示植物检测

见附录B。

6.2 生物化学和分子生物学方法检测

见附录C。

7 质量要求

经湿热空气处理、茎尖嫁接或热处理+茎尖嫁接脱毒处理所得苗木,每株需经检测,用指示植物检测不显症状者或用生物化学和分子生物学方法检测呈阴性者为合格;用指示植物检测有症状者或用生物化学和分子生物学方法检测呈阳性者为不合格。

附录 A

(规范性附录)

茎尖嫁接用培养基配方

表 A.1

MS 固体培养基 mg/L		MS 液体培养基 mg/L	
NH ₄ NO ₃	1 650	NH ₄ NO ₃	1 650
KNO ₃	1 900	KNO ₃	1 900
CaCl ₂ ·2H ₂ O	440	CaCl ₂ ·2H ₂ O	440
MgSO ₄ ·7H ₂ O	370	MgSO ₄ ·7H ₂ O	370
KH ₂ PO ₄	170	KH ₂ PO ₄	170
KI	0.83	KI	0.83
H ₃ BO ₃	6.2	H ₃ BO ₃	6.2
MnSO ₄ ·4H ₂ O	22.3	MnSO ₄ ·4H ₂ O	22.3
ZnSO ₄	8.6	ZnSO ₄	8.6
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.025	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.025
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.002 5	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.002 5
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.0025	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.002 5
Na ₂ EDTA	37.3	Na ₂ EDTA	37.3
FeSO ₄ ·7H ₂ O	27.8	FeSO ₄ ·7H ₂ O	27.8
琼脂	12 g	盐酸硫胺素	0.1
蒸馏水	1 000 ml	盐酸吡哆醇	0.5
		烟酸	0.5
		肌醇	100
		蔗糖	75 g
		蒸馏水	1 000 ml

附录 B

(资料性附录)

应用指示植物检测柑橘病毒病和类似病毒病害

表 B.1

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 香橼的亚利桑那-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	
衰退病	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	

附录 C

(资料性附录)

应用生物化学和分子生物学方法检测柑橘病毒病和类似病毒病害

表 C.1

方 法		检 测 对 象
生物化学	血清学	A 蛋白酶联免疫吸附法 (DAS-ELISA)
		双抗体夹心酶联免疫吸附法 (DAS-ELISA)
		双向聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sPAGE)
分子生物学		多聚酶链式反应 (PCR)
		反转录多聚酶链式反应 (RT-PCR)
		半巢式反转录多聚酶链式反应 (Semi-nested RT-PCR)