前　言

本标准根据农业部1993年下达的制定行业标准《苹果无病毒苗木繁育规程》计划编制。

本标准的附录A、附录B、附录C都是标准的附录。

本标准由中华人民共和国农业部提出。

本标准由中国农业科学院果树研究所、河北农业大学、农业部农业司、山东省农业厅果茶站、辽宁省农业厅果蚕站负责起草。

本标准主要起草人：王国平、马宝焜、史光瑚、孔庆信、孙守友、洪霓。

中华人民共和国农业行业标准

苹 果 无 病 毒 苗 木

NY 329—1997

Virus-free seedling of apple

1 范围

本标准规定了苹果无病毒苗木的质量要求，适用于全国各苹果苗木产地及栽培区。

2 引用标准

下列标准所包含的条文，通过在本标准中引用而构成为本标准的条文。本标准出版时，所示版本均为有效。所有标准都会被修订，使用本标准的各方应探讨使用下列标准最新版本的可能性。

GB 8370—87 苹果苗木产地检疫规程

GB 9847—88 苹果苗木

GB 12943—91 苹果无病毒母本树和苗木检疫规程

3 定义

本标准采用下列定义。

3.1 苹果无病毒母本树

指用苹果无病毒原种材料繁育的用于提供品种接穗或营养系砧木的母株。

3.2 苹果无病毒砧木

指用无病毒无性系砧木母本树材料繁育的无性系砧木或未经嫁接的实生砧木。

3.3 苹果无病毒苗木

指用无病毒接穗和无病毒砧木繁育的苹果嫁接苗或用无病毒材料通过组织培养方法繁殖的苹果自根苗。

4 质量要求

4.1 不带下列病毒及类病毒。

4.1.1 苹果绿皱果病毒 Apple green crinkle virus。

4.1.2 苹果锈果类病毒 Apple scar skin viroid。

4.1.3 苹果花叶病毒 Apple mosaic virus。

4.1.4 苹果褪绿叶斑病毒 Apple chlorotic leafspot virus。

4.1.5 苹果茎痘病毒 Apple stem pitting virus。

4.1.6 苹果茎沟病毒 Apple stem grooving virus。

4.2 不带 GB 8370 中规定的检疫对象。

4.3 苗木规格符合 GB 9847 标准的质量要求。

5 检测方法

5.1 田间症状鉴定法

中华人民共和国农业部 1997-12-19 批准　　1998-05-01 实施

5.1.1 苹果绿皱果病毒、锈果类病毒和花叶病毒三种显性病毒在苹果树上有明显症状，可直接在田间进行观察。

5.1.2 三种显性病毒在苹果树上的症状见表1。

表1

病毒种类	主 要 症 状
苹果绿皱果病毒	病株的幼果表面出现水渍状斑块，逐渐发展为凹凸不平畸形果，病部果皮逐渐形成木栓化呈锈色
苹果锈果类病毒	锈果型：先从顶部出现淡绿色水渍状斑块，最后向果梗扩展成栓化锈斑与纵纹。 花脸型：果实着色后表现红绿相间花脸状。 锈果-花脸复合型：呈现有锈斑又有花脸的复合症状
苹果花叶病毒	斑驳型：从小叶脉开始发生鲜黄色病斑，形状不规则，大小不一。 环斑型：病树叶上产生圆形或椭圆形黄色环斑。 花叶型：病斑不规则，有较大的深绿、浅绿相间色。 条斑型：病树叶片沿叶脉失绿黄化。 镶边型：病叶片的边缘发生黄化

5.2 指示植物检测法

5.2.1 苹果褪绿叶斑病毒、茎痘病毒、茎沟病毒三种潜隐病毒和花叶病毒、锈果类病毒可采用木本指示植物检测法。

5.2.2 检测上列五种病毒的木本指示植物是：

a) 苏俄苹果(R 12740-7A)：检测苹果褪绿叶斑病毒；

b) 司派227(Spy 227)或光辉(Radiant)：检测苹果茎痘病毒；

c) 弗吉尼亚小苹果(Virginia crab)：检测苹果茎沟病毒；

d) 兰蓬王(Lord lambourne)：检测苹果花叶病毒；

e) 国光(Ralls)：检测苹果锈果类病毒。

5.2.3 五种病毒在木本指示植物上的主要症状表现见表2。

表2

病毒种类	指示植物症状
苹果褪绿叶斑病毒	5月中下旬以后，在苏俄苹果叶片上出现褪绿斑点，多发生于叶片一侧，病株叶片较健株叶片小。有的向一侧弯曲呈舟形叶，植株矮化，或生长衰弱
苹果茎痘病毒	5月中下旬以后，在光辉指示植物上出现叶片反卷，植株矮化。在Spy 227指示植物上出现叶片反卷、皮层坏死等症状
苹果茎沟病毒	只在弗吉尼亚小苹果上表现症状，病株较健株矮小，叶片小而色淡，有的病株嫁接口周围肿胀，接合部内有深褐色坏死环纹。木质部产生深褐色纵向陷条沟，严重时从外部即可辨认。在温室鉴定中，表现叶部黄斑或环状斑、叶片扭曲变形
苹果花叶病毒	叶片上产生黄斑、沿叶脉条斑
苹果锈果类病毒	弯叶和茎干锈斑、坏死斑

5.2.4 木本指示植物检测法可在田间和温室内进行，其操作步骤分别见附录B和附录C。

5.3 血清学检测法

5.3.1 本法采用A蛋白酶联免疫吸附法(PAS-ELISA)，其操作步骤见附录A。

5.3.2 凡能制备出抗血清的苹果病毒均采用本法进行检测。

6 检验规则

6.1 检验步骤

6.1.1 档案核查：在进行病毒抽样检测之前，要检查无病毒苗圃是否有无病毒苗木生产许可证和无病毒苗木准产数量证明，并要对其使用的接穗，砧木的来源、数量，以及苗木类型、数量进行查核。

6.1.2 圃内检验：苹果无病毒苗木的病毒检测在无病毒苗木生长期间抽样进行。病毒检测方法见本标准第5章。

6.1.3 出圃检验：园艺性状的质量检验按GB 9847规定执行。发现GB 8370中规定的检疫对象时，按该规程处理。

6.2 抽样

6.2.1 苗木规格和检疫对象的检验，其抽样量分别按GB 9847和GB 8370规定执行。

6.2.2 病毒检测抽样数量：繁殖材料来源于无病毒母本园的苗圃，每亩抽检10株，每增加1亩增加2株；直接从国外引进的无病毒种苗或砧木原种，每株都需检测，由此繁育的苗木，按前述办法抽样进行病毒检测。

6.3 判定规则

抽检不带前述6种苹果病毒、GB 8370中的检疫对象，苗木规格符合GB 9847指标要求的为合格，否则为不合格。

7 标志、包装、运输和保管

7.1 标志

7.1.1 苹果无病毒苗木合格证标签由苹果病毒检测管理机构监制和签发。

7.1.2 无病毒苗木合格证标签规格见GB 12943。

7.1.3 每株无病毒苗木都要挂上标签。

7.2 包装

7.2.1 无病毒苗木需按品种和苗木种类(实生砧嫁接苗、矮砧嫁接苗、矮化中间砧苗、自根苗)分别包装。

7.2.2 包装内外都要挂牌标记，注明品种、苗木种类、数量及产地名称。

7.3 运输

运输与普通苗木相同。

7.4 保管

7.4.1 苹果无病毒苗木要与普通苗木隔离存放。

7.4.2 无病毒苗木要有专人负责保管，以防丢失和调换，并要有详细的进出记录，以备查对。

附 录 A
（标准的附录）
A 蛋白酶联免疫吸附法(PAS-ELISA)

A1 包被 A 蛋白

用 0.05 mol/L 碳酸盐缓冲液稀释 A 蛋白纯品，检测工作浓度为 1～5 μg/mL，每孔 100～200 μL，28℃保温 2 h，然后甩干，用 PBST 洗板 3～4 次，每次静止 3～5 min。

A2 加第一抗血清

抗血清用 PBST 稀释，每孔加 100～200 μL，28℃保温 2 h，冲洗(方法同上)。

A3 加抗原样品

取苹果嫩叶或一年生休眠枝条内皮层，加入 5 倍(*m*/*V*)抗原提取液，磨碎后 4 000 r/min 离心 5 min，取上清液，每孔加 100～200 μL，每样品 2～3 孔，每个微孔板需同时设阳性、阴性和空白对照。4℃冰箱过夜，冲洗(方法同上)，第一次冲洗液不得溢出。

A4 加第二抗血清

抗血清用 PBST 稀释，每孔 100～200 μL，保湿和冲洗方法同 A1。

A5 加酶标 A 蛋白

市售辣根过氧化物酶标 A 蛋白用 PBST 稀释至工作浓度，每孔 100～200 μL，保湿和冲洗方法同 A1。

A6 加底物

每孔 100～200 μL，黑暗中室温放置 15～20 min。

A7 中止反应

每孔加 25～50 μL 2 mol/L 硫酸。

A8 结果判断

以空白对照孔调“0”，测定反应液在 492 nm 波长处吸光值，以待检样品平均吸光值/阴性对照平均吸光值≥2 视为阳性。

附 录 B
（标准的附录）
指示植物田间检测法

B1 在 4 月上旬，挑选前一年播种生长整齐一致的砧木实生苗，定植于苗圃中，每行 50～100 株，株行距不小于 15 cm×60 cm。检测圃周围 100 m 以内不得栽植梨树，50 m 以内不得栽植苹果树。

B2 8 月中下旬从待检样本树或待检苗上剪取一年生枝条，作为待检接穗，并按待检树的品种树号编号写好标签，绑缚在待检接穗上。每一待检样本需有 15～20 个饱满芽。

B3 从指示植物母本树上剪取当年生枝条，作为检测接穗，其饱满芽数量相当于待检接穗的 4～5 倍。

B4 上述材料准备就绪后，即可进行嫁接，嫁接采用二重芽接法，先把待检接穗的芽片嫁接在砧木基部，每株嫁接 1～2 个待检芽（如芽量不足用树皮亦可）。一株待检树上接穗在同一行砧木上嫁接 4～5 株，并按待检树的编号挂好标牌。

B5 削取指示植物的芽片嫁接在前项待检芽的上方，两芽相距 1.0～2.0 cm，每一行砧木嫁接同一种指示植物。

B6 嫁接后，第二年苗木发芽前，在指示植物接芽的上方约 1.0～1.5 cm 处剪除砧干。加强肥水管理，及时除萌锄草和防治病虫害，要特别注意食叶性害虫的防治，以免影响检测结果。

B7 从 5 月中下旬开始，每周定期观察指标植物的症状表现，作好观察记录，根据指标植物的症状反应，明确待检树是否还潜带病毒。

附 录 C
（标准的附录）
指示植物温室检测法

C1 于 3 月下旬取上年播种的砧木种子实生苗，栽植于直径 15 cm，高 25 cm 的泥花盆中，作为鉴定用砧木。于 8 月中下旬，将待检树芽片芽接在砧苗基部。每一嫁接株按品种编号挂好标签，每一待检样本嫁接 4 盆。

C2 翌年 2 上中旬，将花盆移入温室内，温室温度白天 20～25℃，夜间 9～15℃，待砧苗开始萌发生长后，用芽接法在相应组合待检芽上方嫁接指示植物接穗。

C3 嫁接后的温室温度控制在 18～26℃，同时要注意防治害虫和控制萌蘖生长，待指示植物发芽长出嫩叶片后，每周观察一次，记载症状表现。

附录　部分标准清理整顿前后标准号对照表

原标准号	现行标准号
GB 2905—82	NY/T 3—1982
GB 2906—82	NY/T 4—1982
GB 3243—82	NY/T 5—1982
ZB B21 001—87	NY/T 66—1987