ICS 65



中华人民共和国农业行业标准

NY/T 000—2024

西番莲（百香果）脱毒种苗生产技术规程

Technique rules for virus-free plantlet production of Passiflora edulis(passion fruit)

征求意见稿
2024-08-24

2024-XX-XX 发布

2024-XX-XX 实施

|  |  |
| --- | --- |
| 中华人民共和国农业农村部 | 发布 |

目  次

[前  言 II](#_Toc175522915)

[1 范围 3](#_Toc175522916)

[2 规范性引用文件 3](#_Toc175522917)

[3 术语和定义 3](#_Toc175522918)

[4 检测对象 4](#_Toc175522919)

[5 脱毒种苗生产流程 4](#_Toc175522920)

[6 脱毒种苗生产 6](#_Toc175522921)

[7 种苗质量要求与检查判断规则 7](#_Toc175522922)

[8 包装、标识、运输及储存 9](#_Toc175522923)

前  言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本文件由农业农村部热带作物及制品标准化技术委员会提出并归口。

本文件起草单位：中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所；福建省农业科学院果树研究所；广西壮族自治区农业科学院；海南金琪智能科技有限公司；贵州正嵘农业开发有限公司。

本文件主要起草人：邢文婷、宋顺、魏秀清、马伏宁、许奕、韦晓霞、黄东梅、吴斌、杨柳、李亮、蒋萍、唐雅君、张宗科、葛峰。

**西番莲（百香果）脱毒种苗生产技术规程**

1. **范围**

本文件规定了西番莲（百香果）脱毒种苗生产过程中培养材料的术语和定义、脱毒种苗生产、西番莲种苗病毒检测种类及方法、种苗包装、运输等要求。

本文件适用于西番莲（百香果）商业化栽培品种的脱毒种苗生产。

1. **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。

NYT 2517-2013《植物新品种特异性、一致性和稳定性测试指南 西番莲》

NY/T 3972-2021《西番莲 种苗》

SN/T 2964-2011《植物病毒检测规范》

NY/T 2678-2015《马铃薯6种病毒的检测RT-PCR法》

NY/T 2678-2015《瓜类种传病毒检疫鉴定方法》

GB 5084-2021《农田灌溉水质标准》

1. **术语和定义**

下列术语和定义适用于本文件。

**3.1**

**西番莲 *Passiflora edulis***

又名百香果(passion fruit)，通常指果实可用于鲜食的主栽品种，包括紫果和黄果及其杂交种的西番莲。

**3.2**

**茎尖脱毒培养 shoot tip virus elimination culure**

取经热处理的较大茎尖（1 mm-5 mm）萌发的腋芽茎尖(1 mm-3 mm)进行组织培养获得无检测病毒植株的过程。

**3.3**

**组培瓶苗 in-agar plantlet**

生长在装有固体培养基（凝固剂通常为卡拉胶或琼脂）的组培瓶中的生根苗。

**3.4**

**脱毒组培苗 virus-free tissue-cultured plantlet**

指通过热处理、茎尖生长点或较大茎尖组织培养技术获得的组培生根苗，经病毒检测，确认不带检测病毒的组培苗，可认定为脱毒组培苗。

**3.5**

**脱毒种苗 free-virus seedlings**

脱毒组培苗经病毒检测，由种苗繁育体系逐代繁殖生产符合质量要求的种苗，根据用途和繁殖代数可分为三级：原原种苗、原种苗、生产种苗。

**3.6**

**脱毒原原种苗 virus-free pre-elite stock**

脱毒组培苗在生物隔离条件下，通过炼苗、移栽驯化，经病毒检测，确认不带检测病毒且未经过代数繁殖的原始植株。

**3.7**

**脱毒原种苗 virus-free stock**

经田间性状鉴定后，用遗传稳定的脱毒原原种苗在生物隔离条件下，繁殖出不带检测病毒的种苗。原种苗用作母本苗，用于生产繁育生产种苗。

**3.8**

**生产用种 certified seed**

脱毒原种苗在生物隔离条件下，按NY/T 3972-2021生产出符合种苗质量要求的脱毒扦插苗或嫁接苗。

1. **检测对象**

主要为侵染西番莲植株的常见病毒，包括黄瓜花叶病毒（cucumber mosaic virus, CMV）、夜来香花叶病毒（Telosma mosaic virus, TeMV）、南瓜蚜传黄化病毒（cucurbit aphid-borne yellows virus, CABYV）、东亚西番莲病毒（East Asian *Passiflora* virus, EAPV）、西番莲木质化病毒（*Passiflora* woodiness virus, PWV）、番茄黄化曲叶病毒（tomato yellow leaf curl virus, TYLCV）、西番莲潜隐病毒（*Passiflora* latent virus, PLV）。

1. **脱毒种苗生产流程**

**5.1 种苗热处理**

田间选择无明显病虫害、生长健壮且具有品种性状的盆栽苗，提前打顶处理，待枝条新抽出长度2~5 cm嫩芽后，放入人工气候培养室内进行热处理（35~40℃）处理10~15 d，或变温处理（33±1℃）和（38±1℃）每隔8 h变换一次，处理30 d；每天光照16 h，光照强度为5000 lx~10000 lx。热处理结束后，立即剪取枝条新生部分进行茎尖培养。

**5.2 外植体消毒**

剪取5.1处理的盆栽苗枝条顶端2-3 cm新生部分，去除嫩叶，自来水冲洗干净后用中性洗涤剂浸泡15 min~20 min，再用流水冲洗至无泡沫。在超净工作台上用70%~75％酒精浸泡45 s，无菌水冲洗2次，在滴2滴Tween 20的0.5%~1.0%次氯酸钠溶液中浸泡5 min~15 min或用0.1%~0.15％HgCl溶液中静置5 min-8 min，无菌水洗4～5次。

**5.3 无菌茎尖筛选**

在超净台内将5.2处理的外植体切成0.5-1.5 cm的茎尖，接种于MS基本培养基上，经过10 d~15 d培养，筛选无污染的茎尖，并接种于含细胞分裂素的新培养基上诱导腋芽萌发。

**5.4 培养条件**

光照强度3000~4500 lx，培养温度22±0.5℃，昼夜16 h/8 h。

**5.5 茎尖脱毒培养方法**

**5.5.1 腋芽茎尖的培养**

待5.3处理的茎尖腋芽萌发伸长至0.5 cm~1.0 cm，切取长度0.1 cm~0.3 cm的腋芽茎尖，迅速接种至芽生长培养基上进行茎枝培养。培养条件：光照强度3000~4500 lx，培养温度25±1℃，昼夜16 h/8 h。对每个腋芽的茎尖材料进行编号。

**5.5.2 芽增殖、继代培养**

根据茎尖的生长状况，每30 d~45 d更换一次新培养基，转接时，切去基部黄化组织，并切成若干个带芽的微茎段，进一步增殖、继代培养；同一个腋芽的茎尖增殖出的材料为同一个芽系，统一编号，继代培养4~5次。培养条件同5.5.1。

**5.5.3 生根诱导培养**

在超净台内，选取主茎长度≥1.5 cm单芽，接种至含生长素的MS培养基中进行生根诱导培养15 d~20 d；培养条件：光照强度5000 lx，培养温度25±1℃，昼夜16 h/8 h。

**5.6 无菌苗热处理与茎尖培养**

**5.6.1 组培瓶苗热处理**

将5.5.3处理获得的组培瓶苗在35~37℃中进行热处理3 d~7 d，光照强度和时长同5.5.3。

**5.6.2 二次茎尖培养**

热处理结束后，立即在超净台内切取长度为0.1 cm~0.3 cm的无菌苗茎尖，并接种至茎尖伸长培养基中进行二次茎尖伸长培养，培养条件同5.5.1。每个茎尖对应5.5.1的腋芽茎尖编号。

**5.6.3 二次芽增殖、生根培养**

当茎尖伸长生长至1.0 cm~2.0 cm时，接种至芽增殖培养基中，每30~45 d继代一次，培养条件同5.5.1。生根诱导培养同5.5.3。

**5.7 再生植株病毒检测**

**5.7.1 材料选择**

将5.6.3培养获得的二次茎尖培养材料，每个编号株系的二次茎尖材料达到10株~15株后，以叶片为检测材料进行病毒检测，检测对象按4执行。

**5.7.2 检测方法**

5.7.2.1 黄瓜花叶病毒检测方法按GB/T 36781-2018执行。

5.7.2.2 夜来香花叶病毒（TeMV）属于马铃薯Y病毒属（*Potyvirus*），南瓜蚜传黄化病毒（CABYV）属于马铃薯卷叶病毒属，二者病毒检测方法按NY/T 2678-2015执行。

5.7.2.3 番茄黄化曲叶病毒检测方法参考NY/T 3081-2017检测，按SN/T 2964-2011的规定执行。

5.7.2.4 东亚西番莲病毒（PWV）、西番莲木质化病毒（PWV）、西番莲潜隐病毒（PLV）检测按SN/T 2964-2011的规定执行。

1. **脱毒种苗生产**

**6.1 脱毒组培苗炼苗**

将组培瓶苗放在智能温室或温度可控的玻璃房中，炼苗7 d~14 d，炼苗后期，在瓶中加入少量的蒸馏水或纯水软化培养基。

6.2 **脱毒原原种苗的生产**

在生物隔离条件下，将6.1组培苗取出，洗净基部培养基，移栽到无菌育苗基质中，用塑料薄膜和遮阳网保湿、遮阴20~30 d，适应自然环境成活的脱毒组培苗即为脱毒原原种苗，为原种苗的生产提供穗条。温度26 ℃~28 ℃，空气相对湿度70%~80%。

**6.3 原原种苗的遗传稳定性鉴定**

利用扦插育苗技术，在严格的操作下培育脱毒原原种苗的扦插苗20株~30株，将其种植田间进行遗传稳定性鉴定。遗传稳定性鉴定按NYT 2517-2013执行。剔除遗传性状与母本不一致的株系。

**6.4 脱毒原种苗生产**

在生物隔离条件下，剪取木质化与半木质化的原原种苗的枝条，在3.0~5.0 ㎎/L IBA溶液中浸泡36 h~38 h或插穗基部膨大后，扦插于无菌育苗基质中培育、获得对应编号的脱毒原种苗，是繁育生产用种苗的母本苗。温度26℃~28℃，空气相对湿度90%以上。

**6.5 脱毒生产种苗**

用无菌基质培育出砧木品种实生苗，砧木品种须具有较强的抗病性和抗逆性。砧木种苗生长至高度为10~15 cm，直径达到3.0 mm以上后，可作为嫁接砧木使用；选择生长健壮、颜色偏紫的当年结果枝，剪取10.0 cm以上穗条，保留1-2个芽眼（芽眼有明显分化为最佳），下端离下芽眼4.0 cm以上，并削成1.0 cm的楔形切口，在嫁接前经植物激素浸泡处理。在嫁接操作过程中，应保证所有物品都经消毒和干净。温度25-30℃，湿度50%-70%，15~20 d可取下嫁接夹，30 d后可转大杯培育。

**6.6 脱毒种苗生产条件**

**6.6.1 生物隔离条件**

具有80目防虫网棚，配备遮阳、湿帘风机、通风系统、水雾系统等设施的智能温控系统，并减少人员出入，周边应无十字花科、茄科及其他易引诱粉虱和蚜虫的作物。

**6.6.2 基质准备与消毒**

育苗基质含草碳、蛭石、珍珠岩成分，用0.5 g/L的多菌灵（80%可湿性粉剂）溶液浸透或经121 ℃，105 Kpa条件下，高温消毒30 min，备用。

**6.7 管理**

**6.7.1 水肥管理**

脱毒种苗栽培、生产过程中进行常规水肥管理，灌溉水质应符合GB5084-2021的要求，并经过过滤处理。

**6.7.2 病虫害防治**

棚内宜悬挂黄蓝色诱虫板，悬挂高度1.5~2.0 m，密度以每20 m2悬挂一张25 cm×30 cm大小的色诱虫板为宜。灰霉病防治可用啶酰·腐霉利杀菌剂对种苗叶面进行喷雾。

1. **种苗质量要求与检查判断规则**

**7.1 种苗类型**

种苗类型包括组培瓶苗、扦插苗、嫁接苗。

**7.2 抽样方法及数量**

按NY/T 2724-2015，不同种苗类型脱毒种苗检测采取随机抽样，不同样品抽样数量见表1，其中组培瓶苗以瓶为单位，扦插苗、嫁接苗以株为单位。

**表1 抽样数量**

|  |  |
| --- | --- |
| 种苗数量 | 抽样数量 |
| 不超过1000 | 20 |
| 不超过5000 | 40 |
| 不超过10000 | 60 |
| 超过10000 | 80 |

**7.3 判定规则**

**7.3.1 种苗要求**

7.3.1.1 组培苗：按NY/T 2306-2013，组培苗粗壮，叶片挺直、有层次感，色泽正常，根系色白健壮，根基处基本无愈伤或少愈伤，同一批苗整齐度达95%以上，变异率低于5%。

7.3.1.2 脱毒原种苗、生产种苗应符合NY/T3972-2021扦插苗、嫁接苗基本要求。

**7.3.2 质量标准**

7.3.2.1 按NY/T 3972-2021，脱毒种苗按NY/T3972-2021质量要求分一级和二级，低于二级的脱毒种苗不应作为商品苗。

**表2 西番莲（百香果）脱毒原种苗（扦插苗）分级指标**

|  |  |
| --- | --- |
| 项 目 | 等级 |
| 一级 | 二级 |
| 新稍茎粗（*D*） | *D*≥0.25 | 0.25>*D*≥0.23 |
| 新稍长度（*L*） | *L*≥10.0 | 10.0>*L*≥6.0 |
| 叶片数，片 | ≥5 | 3~4 |
| 品种纯度，% | ≥98.0 |

7.3.2.2 生产种苗按NY/T 3972-2021，按嫁接小苗等级、嫁接大苗等级分一级和二级，低于二级的脱毒种苗不应作为商品苗。

**表3 西番莲（百香果）脱毒生产种苗（嫁接苗）分级指标**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 项 目 | 嫁接小苗 | 嫁接大苗 |
| 一级 | 二级 | 一级 | 二级 |
| 新稍茎粗（*D*），cm | *D*≥0.26 | 0.26>*D*≥0.24 | ≥0.28 | 0.28>*D*≥0.24 |
| 新稍长度（*L*），cm | *L*≥20.0 | 20.0>*L*≥10.0 | *L*≥50 | 50.0>*L*≥30.0 |
| 叶片数，片 | ≥5 | 3 | ≥9 | 6~8 |
| 品种纯度，% | ≥98.0 |

**7.4 判定规则**

脱毒种苗判定按NY/T 3972-2021执行。

**7.5不合格种苗处理**

病毒检测不合格的，组培瓶苗按6.6.2消毒方式处理，脱毒种苗采用焚烧方式处理。

1. **包装、标识、运输及储存**

出圃的脱毒种苗的包装、标识、运输及储存按NY/T 3972-2021执行。

**附 录 A**

**(资料性附录)**

**培养基配方**

**A.1 不同组培阶段参考培养基**

外植体腋芽萌发培养基：MS+2.0 mg/L 6-BA+0.5 mg/L ZT+30 g/L 白沙糖+6.5 g/L 琼脂粉，pH5.8~6.0

增殖、继代培养基：紫果，MS+0.5 mg/L 6-BA+0.02 mg/L ZT+ 30 g/L 白沙糖+6.5 g/L 琼脂粉，pH5.8~6.0；黄果，1/2MS+1.5 mg/L 6-BA+0.03 mg/L ZT+0.01mg/L IBA+ 30 g/L 白沙糖+6.5 g/L 琼脂粉，pH5.8~6.0

生根培养基：紫果，MS+3.5 mg/L IBA+15 g/L 白沙糖+6.5 g/L 琼脂粉，pH6.0；黄果，1/2MS+0.5 mg/L NAA+ 15 g/L 白沙糖+6.5 g/L 琼脂粉，pH5.8~6.0。

**A.2 植物生长调节剂配制**

见表A.2。

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 名称 | 配制方法 | 存储方式 |
| 6-苄基嘌呤（6-BA） | 称取100 mg 6-BA于烧杯中，加入少量去离子水后用NaOH颗粒充分溶解后，转入100 mL容量瓶中，用去离子水清洗烧杯2~3次，最后用去离子水定容至100 mL | 密封，4℃避光保存 |
| 吲哚丁酸（IBA） | 称取100 mg IBA或NAA于烧杯中，加入少量去离子水后用NaOH颗粒充分溶解后，转入100 mL容量瓶中，用去离子水清洗烧杯2~3次，最后用去离子水定容至100 mL |
| 萘乙酸（NAA） |
| 注1：本表中所用药品纯度均为BR级。注2：本表中所用容器均需在使用前用去离子水清洗2~3次。 |