

四个苹果砧木和品种苹果潜隐性病毒的变温热处理脱毒效果分析

郭 超, 吴 然, 邵建柱, 孙建设, 师校欣

(河北农业大学 园艺学院, 河北 保定 071000)

摘 要:以同时携带 ASPV、ACLSV、ASGV 3 种潜隐性病毒的“八棱海棠”、“小金海棠”、“华红”和“JAZZ”组培苗为试材,分别采用 2 种变温热处理方式结合茎尖培养的脱毒方法,运用 RT-PCR 技术对组培苗内病毒进行跟踪检测,研究了不同苹果品种和砧木对变温热处理结合茎尖培养脱除苹果潜隐性病毒的反应以及脱毒苗的适宜检测时机。结果表明:变温热处理条件不同,病毒脱除效果不同。同一热处理条件下,不同苹果基因型其病毒脱除率也不同。“小金海棠”脱毒率最高,“JAZZ”和“八棱海棠”次之,“华红”最低。同时,不同病毒种类的被脱除率存在差异,ASPV 最容易脱除,ACLSV 居中,ASGV 最难脱除。脱毒完成后 180 d,病毒总检出率最高;220 d,3 种病毒均有检出,检出顺序为 ASGV 最先,ACLSV 次之,ASPV 最晚。因此,对脱毒苗进行多次跟踪检测十分必要。

关键词:苹果潜隐性病毒;脱毒;复发

中图分类号:S 661.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)17-0130-05

目前,我国苹果的栽培面积和总产量均居世界前列,但单产低,品质差,病毒病是造成这一现象的重要原因之一^[1]。研究报道,苹果潜隐性病毒在我国苹果主产区普遍存在,果园病毒侵染率高达 100%^[2],其中河北省遭受病毒病害尤为严重。苹果潜隐性病毒包括苹果茎沟病毒(Apple Stem Grooving Virus, ASGV)、苹果茎痘病毒(Apple Stem Pitting Virus, ASPV)和苹果褪绿叶斑病毒(Apple Chlorotic Leaf Spot Virus, ACLSV)。该类病毒虽无明显症状,但可导致果树树势变弱,果品品质变劣,给果树生产带来极大危害^[3]。目前,针对此类病毒病尚无有效的防治药剂,无毒苗木的生产成为解决病害的根本途径^[4]。培育脱毒苗是苹果无毒化栽培的关键。我国从 20 世纪 80 年代初开始研究苹果脱毒技术以来,至今已取得相当大的进展^[5-7]。其中,变温热处理结合茎尖培养因其脱毒率高,幼苗死亡率低,茎尖成活率高等优点,成为苹果潜隐性病毒脱除方法的首选。但变

温热处理的效果除考虑脱毒率外,还应综合品种耐热性,增殖性以及茎尖成活状况等各种因素。因此,对苹果变温热处理方法的细化研究,使之成为在生产中切实可行的方法十分必要。

苹果病毒的检测方法主要有指示植物法、血清学和分子生物学方法等。近年来发展起来并逐渐成熟的 RT-PCR 技术,具有灵敏度高、特异性强、适应范围广以及操作简便等优点,成为当前苹果病毒检测最有力的工具^[8],并且逐步应用于梨和苹果等脱病毒苗木的筛选上^[8-9]。但是采用该技术对苹果脱毒组培苗进行多次跟踪检测,以明确随时间的推移病毒是否复现这一问题尚鲜见报道。

该研究通过变温热处理结合茎尖培养,研究了离体条件下 4 个不同的苹果品种和砧木对热处理脱毒的反应以及脱毒后病毒的复现规律,旨在进一步明确变温热处理的脱毒效果及脱毒苗最佳检测时机,以期苹果苗木无毒化生产奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验材料为河北农业大学园艺学院生物技术实验室保存、经 RT-PCR 检测确定同时携带 ASGV、ASPV 和 ACLSV 3 种潜隐性病毒的砧木“八棱海棠”和“小金海棠”以及品种“华红”和“JAZZ”组培苗。为了保证试材的一致性,试管苗均由该品种或砧木 1 个茎尖继代增殖而

第一作者简介:郭超(1988-),女,河北石家庄人,硕士研究生,现主要从事苹果病毒传播途径等研究工作。E-mail:guochao996617897@163.com.

责任作者:邵建柱(1970-),男,河北石家庄人,教授,现主要从事果树脱毒及无病毒苗木繁育技术等研究工作。E-mail:shaojzh@21cn.com.

基金项目:国家苹果产业技术体系资助项目(CARS-28)。

收稿日期:2014-04-25

来。阳性对照为同时携带 3 种病毒的组培苗,阴性对照为无毒组培苗。

继代培养基为 MS + BA 1.0 mg/L + NAA 0.04 mg/L + 白砂糖 30 g/L + 琼脂 6 g/L, pH 6.5。

主要试剂为 RNAiso-mate for Plant Tissue 和 RNAiso Plus(大连宝生物)、EasyScript First-Strand cDNA synthesis Supermix(北京全式金生物技术有限公司)、2× Es TaqMasterMix(北京康为世纪生物科技有限公司)。

1.2 试验方法

1.2.1 变温热处理结合茎尖培养方法 将 4 种试材若干株分别取 1 cm 新梢接于继代培养基上,置于培养室中预培养 5~7 d 后,将试材分为 2 组进行热处理。第 1 组将 4 个品种和砧木置于光照培养箱,热处理条件(I)为 38℃,8 h,光照培养;32℃,16 h,黑暗培养;第 2 组选择“八棱海棠”和“JAZZ”作为热处理的材料,热处理条件(II)为 38℃,8 h,光照培养;32℃,8 h,黑暗培养。热处理 40 d 后,统计死亡率。对存活的组培苗剥取长度为 0.5~1.0 mm 茎尖,转接于继代培养基,常规培养 30 d 后统计茎尖成活率。待幼苗长势良好,适宜进行取样检测(50 d)时,进行第 1 次检测。之后,选择热处理 I 的苗子常规继代培养,分别于 150、180、220 d 进行后续的病毒跟踪检测(检测时间的确定自热处理结束之日起)。

1.2.2 RNA 提取和病毒检测方法 采用 RNAiso-mate for Plant Tissue 和 RNAiso Plus 2 种试剂进行总 RNA

的提取^[10]。苹果潜隐性病毒的检测参照陈红霞等^[11]的两步多重体系方法。

1.2.3 结果统计 热处理后苗子死亡率和茎尖转接成活率统计:植株死亡率(%)=(热处理后受害植株数/热处理样本总数)×100%;茎尖成活率(%)=(转接的成活茎尖数/转接茎尖总数)×100%。病毒检测结果进行脱毒率和病毒平均检出率统计:脱毒效率(%)=(检测呈阴性样本数/检测样本总数)×100%;病毒平均检出率(%)=(检出带病毒样本数/检测样本总数)×100%。

2 结果与分析

2.1 变温热处理对植株生长的影响

由表 1 可知,经 2 种变温热处理后,植株的受害情况及转接茎尖成活情况存在一定的差异。在热处理 I 条件下,4 种试材的植株死亡率由高到低为“小金海棠”(27.5%)>“JAZZ”(17.7%)>“八棱海棠”(9.1%)>“华红”(3.7%)。热处理 II 中,“八棱海棠”和“JAZZ”植株均无死亡现象。

2 种热处理条件对转接茎尖的成活情况影响不大,成活率较高,均在 90.0%以上。但“八棱海棠”茎尖成活率在热处理 I(96.7%)中高于热处理 II(94.3%),与“八棱海棠”相反,“JAZZ”茎尖成活情况为热处理 II 高于热处理 I。可见热处理条件对 4 个品种和砧木的受害情况及茎尖成活率的影响具有一定的特异性。

表 1 热处理对植株生长和转接茎尖成活率的影响

Table 1 Effect of heat treatment on the plant growth and survival rate of shoot tips

品种和砧木 Cultivars and rootstocks	热处理条件 Heat treatment	植株死亡率 Plant mortality/ %	植株表现症状 Plants symptom	转接茎尖数 No. of shoot tips inoculated/个	茎尖成活率 Survival rate of shoot tips/ %
“八棱海棠”	I	9.1(20/219)	生长良好,基部叶片萎黄	30	96.7
“小金海棠”		27.5(14/51)	生长良好,大部分叶片纤细	13	100.0
“华红”		3.7(4/108)	长势一般,基部叶片萎黄	10	90.0
“JAZZ”		17.7(14/79)	长势偏弱,茎干纤细	10	90.0
“八棱海棠”	II	0(0/300)	长势良好	35	94.3
“JAZZ”		0(0/53)	长势良好	5	100.0

2.2 不同热处理条件病毒脱除效果

由表 2 可知,“八棱海棠”采用热处理 I 脱毒,其脱毒率 75.9%明显高于热处理 II 的 68.6%;而“JAZZ”脱毒效果

较好的为热处理 II。可见相同的苹果基因型,采用不同的热处理条件进行脱毒,其脱毒率存在一定程度的差异。

表 2 不同热处理条件病毒脱除效果检测

Table 2 Effect of different heat treatments on latent virus elimination

热处理条件 Heat treatment	品种和砧木 Cultivars and rootstocks	检测苗数 No. of samples detected/株	脱毒苗数 No. of virus-free samples/株	脱毒率 Elimination rate/ %
I	“八棱海棠”	29	22	75.9
II		35	24	68.6
I	“JAZZ”	9	7	77.8
II		5	4	80.0

2.3 不同苹果基因型的脱毒效果

由表 3 可知,在相同的热处理条件下,苹果基因型不同,病毒的脱除效果不同。热处理 I 条件下,“小金海

棠”脱毒效果最好,达到 92.3%,其次为“JAZZ”(77.8%)和“八棱海棠”(75.9%),“华红”脱毒率最低仅为 44.4%。在热处理 II 条件下,“JAZZ”脱毒效果(80.0%)优于“八棱

表 3 不同苹果基因型脱毒效果检测

Table 3 The detection results of different apple genotypes on latent virus elimination

品种和砧木 Cultivars and rootstocks	热处理条件 Heat treatment	检测苗数 No. of samples detected/株	脱毒率 Elimination rate/%
“八棱海棠”	I	29	75.9
“小金海棠”		13	92.3
“华红”		9	44.4
“JAZZ”		9	77.8
“八棱海棠”	II	35	68.6
“JAZZ”		5	80.0

海棠”(68.6%)。因此苹果品种或砧木不同,潜隐性病毒被脱除的难易程度存在差异。

表 4

不同病毒类型的脱除差异性

Table 4 The differences of single virus elimination

病毒类型 Virus species	热处理条件 Heat treatment	品种和砧木脱毒率 Elimination rate of cultivars and rootstocks/%			
		“八棱海棠”	“JAZZ”	“小金海棠”	“华红”
ASGV	I	79.3(23/29)	77.8(7/9)	92.3(12/13)	44.4(4/9)
ASPV		96.6(28/29)	100.0(9/9)	100.0(13/13)	100.0(9/9)
ACLSV		89.7(26/29)	100.0(9/9)	100.0(13/13)	100.0(9/9)
ASGV	II	74.3(26/35)	80.0(4/5)	—	—
ASPV		97.1(34/35)	100.0(5/5)	—	—
ACLSV		88.6(31/35)	100.0(5/5)	—	—

注:“—”表示没有此处理。

2.5 不同时间病毒检出率比较

由图 1 可知,热处理完成后,50 d 和 150 d 取样检测,仅“八棱海棠”分别有 3.4%和 3.7%的病株检出;而在 180 d 检测时,4 种试材均有不同程度的带毒苗检出,病毒苗检出率由高到低分别为“华红”(62.5%)、“JAZZ”(50.0%)、“八棱海棠”(40.0%)、“小金海棠”(10.0%)。220 d,4 种试材的病毒检出率呈下降趋势,除“八棱海棠”病株检出率仍较高(20.0%)外,其它 3 种试材均未检出带毒株。由此可知,在脱毒完成后,病毒检出率呈现由低到高再降低的趋势,并且 180 d 左右,检出率达到高峰,脱毒不彻底的材料很大程度上会被检出。

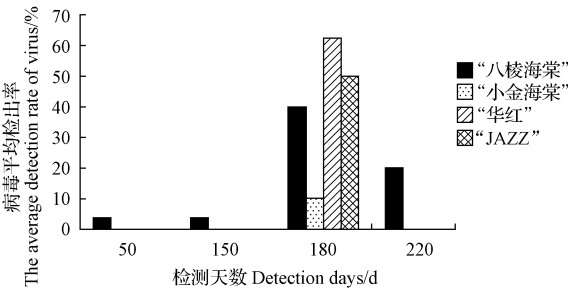


图 1 不同检测时间 4 个品种和砧木病毒平均检出率比较

Fig. 1 Comparison of different detection time on average infection rate of cultivars and rootstocks

由图 2 可知,对于不同病毒来说,4 次检测均显现 ASGV 的检出率最高,其次是 ACLSV,ASPV 检出率最

2.4 不同病毒类型脱毒效果比较

由表 4 可知,在相同的热处理条件下,3 种病毒在 4 种不同的品种和砧木中,被脱除的难易程度亦表现出一定的规律。在热处理 I 条件下,“八棱海棠”的 3 种病毒脱除率由高到低为 ASPV(96.6%)>ACLSV(89.7%)>ASGV(79.3%);在“JAZZ”、“华红”和“小金海棠”中,最难脱除的也是 ASGV,ACLSV 和 ASPV 可以被彻底脱除。在热处理 II 条件下,3 种潜隐病毒被脱除的难易趋势与热处理 I 相同。因此,在 4 种不同苹果基因型中,ASGV 为最难脱除的病毒,同时即便热处理条件不同,3 种病毒被脱除由难到易的顺序均为 ASGV、ACLSV 和 ASPV。

低。在 50 d 和 150 d 分别有 1.7%的 ASGV 被检出;180 d ASGV 检出率较高为 37.0%,ACLSV 开始被检出,检出率为 3.7%;到 220 d ASGV 检出率降低至 5.9%,ACLSV 检出率增加至 5.9%,ASPV 开始被检出,检出率为 2.9%。此时 3 种病毒均能被检出。可见,脱毒不彻底的试材,会随着培养时间的延长,带毒苗逐渐被检出,且病毒的复现顺序为 ASGV、ACLSV,最后是 ASPV。

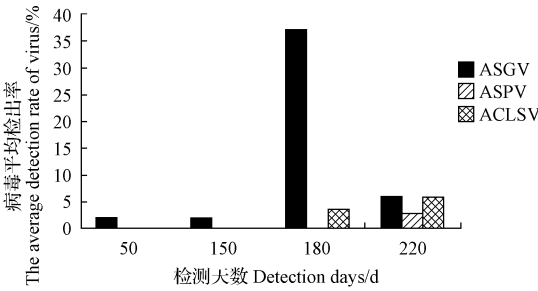


图 2 不同检测时间 3 种病毒平均检出率比较

Fig. 2 Comparison of different detection time on average infection rate of single virus

3 讨论

目前,常用的组培苗热处理脱毒方法有 2 种:恒温热处理和变温热处理。研究表明^[7,12-13],恒温热处理对组培苗伤害过大,而变温热处理弥补了该不足,结合茎尖培养获得的苗子脱毒效果较好。晏娜等^[14]研究报道,采用 38℃/32℃变温热处理适合大多数品种和砧木脱除

苹果潜隐性病毒^[14]。故该试验采用 38℃/32℃ 变温热处理对 4 种试材进行脱毒,发现在相同热处理条件下,苹果基因型(即病毒寄主)不同,病毒脱除效率不同。这与 Cropley^[15] 和程玉琴等^[7] 的观点一致。分析原因可能是由于不同的苹果品种和砧木有其不同的生理特点,导致病毒和寄主之间互作关系不同。同时还发现,热处理条件的改变也影响着品种和砧木的病毒脱除效果。对“八棱海棠”来说,热处理Ⅰ脱毒效果较好;而“JAZZ”作为热处理材料时,热处理Ⅱ脱毒率更高。可见很难寻找到一种普遍适用的热处理条件,使其对所有品种和砧木均达到最佳脱毒效率。在实际生产中,应根据品种和砧木的特点,有针对性地微调热处理条件,脱毒效果方能最优化。对于怎样经济有效的利用变温热处理脱除特定品种的病毒,仍需进一步研究。

该研究中,3 种病毒各自的脱除率存在显著差异。总体表现为 ASGV 最难脱,脱毒率大多在 70%~80% 之间,ACLSV 居中,ASPV 最容易脱除,脱除率高达 95% 以上,其中 ACLSV 和 ASPV 两者脱除率差异不大。不同病毒类型脱除率不同的原因,除与热处理条件和寄主有关外,还可能与病毒本身的特性和结构有直接关系。由 3 种病毒的病原学研究发现^[16-19],三者形态长度、体外钝化温度和体外保存时间均存在明显差异,且表现出一定的规律性。在长度上,ASGV 最短,ACLSV 居中,ASPV 最长;在体外钝化温度上,由高到低为 ASGV>ACLSV>ASPV;在低于 25℃ 的体外保存时间上,由长到短为 ASGV>ACLSV>ASPV。病毒特性的规律性与病毒脱除难易规律高度一致,那么这些特性是否与病毒的脱除相关,还需进一步研究。

早前关于脱病毒苗木检测的研究,更多的是利用血清学技术对脱毒苗进行仅一次检测^[20-22]。而该试验运用灵敏度高,特异性强的 RT-PCR 技术,对脱毒苗进行了多次跟踪检测,首次证明了脱毒苗并不等同于无毒苗。从结果来看,4 次检测中,均有脱毒不彻底的材料检出,且 180 d 时病毒检出率最高。故大胆推测,180 d 左右就可能是脱毒所残留的少量病毒的高复发、高检出时期。分析脱毒 6 个月后才出现高检出现象的原因,可能是由于茎尖的特性,即茎尖部位不含病毒粒子或者病毒含量极低;再加之热处理使病毒受到高温胁迫,增殖系数降低,低含量病毒维持了较长一段时间,而现有检测手段不能在该阶段高效筛出带毒苗,经过长时间的继代培养,未完全脱掉的对热处理敏感度较低的病毒逐渐恢复其增殖力,病毒含量升高,达到检测高峰。该研究还发现,不同病毒的检出时间是存在差异的。究其根源可能是病毒的特性不同,对热处理敏感程度亦不同,最终影响了病毒增殖力的恢复。有研究提到脱毒法的处理

效果有的是永久性的,更多的可能仅仅是短暂治疗效果^[23]。也有研究指出,经过病毒检测的植株仍有可能重新感染^[24]。上述结果证实了脱毒苗确实存在病毒复发的风险。为解决该问题,从脱毒方法上考虑,进行二次热处理是否会更高效,需进一步验证。至于确定更精准适宜的检测时间,还需进一步明确脱毒苗残存病毒的增殖规律。

综上,脱毒组培苗的检测工作都不是一劳永逸的,而更应该进行跟踪式检测,不断的淘汰和筛选,才能保证脱毒苗的“去伪存真”,真正意义上实现脱毒苗的无毒化。

参考文献

- [1] 王国平. 果树病毒检测与脱除技术的研究进展[J]. 华中农业大学学报, 2004(6): 685-691.
- [2] 陈红霞. 我国苹果主产区潜隐性病毒感染特征研究[D]. 保定: 河北农业大学, 2012.
- [3] 程玉琴, 韩振海, 徐雪峰. 苹果病毒及其脱毒检测技术研究进展[J]. 中国农学通报, 2003, 19(1): 72-73, 96.
- [4] 王国平. 苹果病毒病防治[M]. 北京: 金盾出版社, 1994.
- [5] 王焕玉, 刘福昌, 薛光荣, 等. 苹果母本树脱除病毒的研究[J]. 中国果树, 1991(4): 15-17, 35.
- [6] 董淑英, 位绍文, 孙静, 等. 苹果脱毒方法的比较研究[J]. 莱阳农学院学报, 2002, 19(2): 112-115.
- [7] 程玉琴, 徐践, 张勇, 等. 苹果品种和砧木组培苗对热处理脱毒的反应[J]. 植物保护科学, 2003, 19(6): 216-219.
- [8] 王壮伟. 苹果潜隐性病毒的检测与脱除技术研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2006.
- [9] 胡晶. 变温热处理结合茎尖培养脱除沙梨离体植株潜隐病毒研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2011.
- [10] 曹晓凤, 邵建柱, 孙建设. 几种提取液对苹果成熟叶片总 RNA 提取质量的影响[J]. 安徽农业科学, 2011, 39(5): 2570-2571, 2607.
- [11] 陈红霞, 邵建柱, 孙建设, 等. 两步多重 RT-PCR 快速检测苹果潜隐性病毒[J]. 果树学报, 2012, 29(4): 695-701.
- [12] 王利平. 热处理和化学处理对梨离体植物中病毒的影响[D]. 武汉: 华中农业大学, 2006.
- [13] 谭荣荣. 物理及化学处理脱除砂梨潜隐病毒研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2006.
- [14] 晏娜, 孙建设, 邵建柱. 22 个苹果品种和砧木试管苗对热处理脱毒效应的研究[J]. 河北农业大学学报, 2009, 32(5): 40-44.
- [15] Cropley R. Comparison of some apple latent viruses[J]. Annals of applied Biology, 1968, 61: 361-367.
- [16] 洪霓, 王国平, 于济民, 等. 苹果茎沟病毒的分离纯化及血清学检测[J]. 中国农业科学, 1997, 30(5): 6-12.
- [17] 吴雅琴, 王文慧, 章德明, 等. 苹果茎痘病毒病原学研究初报[J]. 河北果树, 2000(4): 7, 19.
- [18] German S, Candresse T, Le Gall O, et al. Analysis of the dsRNAs of apple chlorotic leaf spot virus[J]. Journal of General Virology, 1992, 73: 767-773.
- [19] 姜中武, 张振英, 都韶英. 苹果褪绿叶斑病毒的特性与为害[J]. 烟台果树, 1995(4): 23-24.
- [20] 赵霜, 李青, 时颂. 不同处理方法对菊花‘神马’脱除病毒的影响[J]. 东北林业大学学报, 2013, 41(3): 103-106.

壳聚糖涂膜处理对低温贮藏芦笋保鲜效果的影响

王向阳, 陈贝莉, 潘丽秀, 黄建颖

(浙江工商大学 食品与生物工程学院, 浙江 杭州 310018)

摘要:以绿芦笋为试材,研究了 0.6% 高分子壳聚糖(HMC)和 0.6% 低分子壳聚糖(LMC)对 4℃ 条件贮藏绿芦笋的保鲜效果,测定了绿芦笋的感官品质、失重率、硬度、木质素含量、相对电导率、丙二醛含量(MDA)、叶绿素含量、维生素 C 含量。结果表明:0.6% HMC 处理显著降低绿芦笋失重率,抑制嫩茎硬化,延缓维生素 C 和叶绿素降解,降低细胞膜渗漏;使绿芦笋贮藏期从 21 d 延长至 35 d。

关键词:壳聚糖;绿芦笋;贮藏

中图分类号:S 609⁺.3 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)17-0134-04

绿芦笋(*Asparagus officinalis* L.) 属百合科天门冬属多年生宿根草本植物^[1],嫩茎为可食用部分。其茎

体质嫩味美、营养丰富,药用价值高,深受消费者喜爱。由于绿芦笋采后新陈代谢作用旺盛,易失水腐烂,茎体硬化,木质素增加,叶绿素降解,从而降低了食用价值和商品价值。目前,应用于绿芦笋采后保鲜技术的研究主要有 CaCl₂ 处理^[2]、酪蛋白酸钠涂膜^[3]、高浓度 CO₂ 处理^[4]、低温冷藏^[5]、1-MCP 结合低温处理^[6]、NO 调控^[7]

第一作者简介:王向阳(1966-),男,博士,教授,博士生导师,现主要从事食品保鲜加工等研究工作。E-mail:wxy200228@aliyun.com。

基金项目:浙江省科技资助项目(2011C12031)。

收稿日期:2014-05-05

[21] 高慧卿,樊兰瑛,王秀红,等. 茎尖培养及热处理技术在百合脱毒中的应用研究[J]. 山西农业大学学报,2010,30(6):528-532.

[22] 董雅凤,张尊平,张少瑜,等. 苹果和梨树茎尖培养结合热处理脱病毒研究[J]. 北方果树,2002(2):9-11.

[23] 晏娜. 化学处理和热处理脱除苹果潜隐性病毒的研究[D]. 保定:河北农业大学,2009.

[24] 江峰,孙振华. 苹果试管苗热处理脱毒法的研究[J]. 落叶果树,2000(1):4.

Study on Elimination and Recrudescence of Apple Latent Virus by Alternating Heat Therapy *in vitro*

GUO Chao, WU Ran, SHAO Jian-zhu, SUN Jian-she, SHI Xiao-xin
(College of Horticulture, Agricultural University of Hebei, Baoding, Hebei 071000)

Abstract: Taking four apple rootstocks and cultivars ('*Malus robusta* Rehd.', '*Malus xiaojinensis*.', '*Huahong*', '*JAZZ*') infected with ASPV, ACLSV and ASGV as materials, alternating heat therapies in combination with shoot tip culture were used to eliminate apple viruses, the RT-PCR system was used to detect and real-time track viruses in virus-free plantlets, the responses to alternating heat therapy in combination with shoot tip culture on latent virus elimination and suitable detection time in different cultivars and rootstocks *in vitro* were studied. The results showed that under different heat treatment conditions, rates of virus-elimination were different. Rates of virus-elimination under same treatment differed from plant to plant. '*Malus xiaojinensis*' listed the top followed by '*JAZZ*' and '*Malus robusta* Rehd.', while '*Huahong*' ranked number three. However, viruses were always inactivated in the same order: first ASPV, followed by ACLSV, last ASGV. Additionally, among the four detections, the detection rate of ASGV was highest. About 180 days, the detection rate of all latent virus reached a peak. Until 220 days, ASGV, ASPV and ACLSV were detected completely. And the detection sequence was that ASGV was detected first, ACLSV followed, ASPV was the latest. So it was necessary to examine more than once in apple virus-free seedlings.

Keywords: apple latent virus; elimination; recrudescence