ICS 65.020
B 16

NY

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 2377—2013

葡萄病毒检测技术规范

Code of practice for the detection of grapevine viruses

2013-09-10 发布　　2014-01-01 实施

中华人民共和国农业部 发布

前　言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由农业部种植业管理司提出。

本标准由全国果品标准化技术委员会(SAC/TC 510)归口。

本标准起草单位:中国农业科学院果树研究所、农业部果品及苗木质量监督检验测试中心(兴城)。

本标准主要起草人:董雅凤、张尊平、范旭东、任芳、刘凤之、聂继云。

葡萄病毒检测技术规范

1 范围

本标准规定了葡萄主要病毒检测技术的术语和定义、检测对象、检测方法和检测结果的判定。

本标准适用于葡萄接穗、插条、苗木、组培苗、田间植株中主要葡萄病毒的检测。

2 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。

NY/T 1843 葡萄无病毒母本树和苗木

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

葡萄无性繁殖材料 grapevine asexual propagation materials

用于嫁接繁殖葡萄苗木的接穗或扦插繁殖葡萄苗木的插条。

3.2

葡萄苗木 grapevine nursery stock

采用品种接穗和砧木嫁接繁育的葡萄嫁接苗，以及通过扦插、组织培养等方法繁育的葡萄自根苗。

3.3

葡萄组培苗 grapevine nursery stock from tissue culture

指利用葡萄外殖体，在无菌和适宜的人工条件下，培育的完整植株。

3.4

指示植物 indicator plant

是指被某种或某类病毒侵染后，在适宜的环境条件下，能够表现典型症状的寄主植物。

3.5

酶联免疫吸附测定 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

在固相支持物上(酶联板)包被病毒特异性抗体，加入待测样品后，再用酶标记的病毒抗体进行免疫识别，最后通过酶与底物的颜色反应检测病毒是否存在的一种血清学检测方法。

3.6

逆转录聚合酶链式反应 reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)

利用逆转录酶将 RNA 逆转录为 cDNA，再以此为模板并以耐热 DNA 聚合酶和一对引物(与待测目标核酸分子序列同源的 DNA 片段)通过高温(DNA 分子变性)和低温(引物和目标核酸分子复性并被耐热 DNA 聚合酶延伸)交替循环扩增待测目标核酸分子的方法。

4 检测对象

4.1 葡萄扇叶病毒(*Grapevine fanleaf virus*，GFLV)

4.2 葡萄卷叶相关病毒 1(*Grapevine leafroll-associated virus* 1，GLRaV-1)

4.3 葡萄卷叶相关病毒 2(*Grapevine leafroll-associated virus* 2，GLRaV-2)

4.4 葡萄卷叶相关病毒3(*Grapevine leafroll-associated virus* 3,GLRaV-3)

4.5 葡萄卷叶相关病毒4(*Grapevine leafroll-associated virus* 4,GLRaV-4)

4.6 葡萄卷叶相关病毒5(*Grapevine leafroll-associated virus* 5,GLRaV-5)

4.7 葡萄卷叶相关病毒7(*Grapevine leafroll-associated virus* 7,GLRaV-7)

4.8 葡萄病毒A(*Grapevine virus* A,GVA)

4.9 葡萄病毒B(*Grapevine virus* B,GVB)

4.10 葡萄斑点病毒(*Grapevine fleck virus*,GFkV)

4.11 沙地葡萄茎痘病毒(*Grapevine rupestris stem pitting-associated virus*,GRSPaV)

5 检测方法

5.1 指示植物嫁接法

5.1.1 葡萄扇叶病毒、葡萄卷叶相关病毒、葡萄病毒A和葡萄斑点病毒均可采用指示植物进行检测。

5.1.2 采用绿枝嫁接和硬枝嫁接方法,将待检样品嫁接到指示植物,或将指示植物嫁接到待检样品上,每个组合重复3株～5株。

5.1.3 生长季节定期观察指示植物的症状表现,具体操作方法和指示植物症状表现参见附录A。

5.2 酶联免疫吸附法(ELISA)

5.2.1 葡萄扇叶病毒,葡萄卷叶相关病毒1,葡萄卷叶相关病毒2,葡萄卷叶相关病毒3,葡萄卷叶相关病毒5,葡萄卷叶相关病毒7,葡萄病毒A,葡萄病毒B和葡萄斑点病毒等能够获得稳定可靠抗血清的病毒,可采用ELISA方法进行检测。

5.2.2 适宜的检测时期和取样部位参见附录B。

5.2.3 具体检测程序参见附录C。

5.3 逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)

5.3.1 葡萄扇叶病毒,葡萄卷叶相关病毒1,葡萄卷叶相关病毒2,葡萄卷叶相关病毒3,葡萄卷叶相关病毒4,葡萄卷叶相关病毒5,葡萄卷叶相关病毒7,葡萄病毒A,葡萄病毒B,葡萄斑点病毒和沙地葡萄茎痘病毒均可采用RT-PCR方法进行检测。

5.3.2 适宜的检测时期和取样部位参见附录B。

5.3.3 具体检测程序参见附录D。

6 检测结果判定

根据附录A、附录C和附录D判定检测结果。检测结果呈阳性,即判定该样品携带相应的病毒;检测结果呈阴性,应进行复检。如采用2种以上的检测方法,且检测结果不一致,则以阳性结果为准,判定该样品携带相应的病毒。

对葡萄无病毒母本树和苗木进行检测时,应根据NY/T 1843的要求进行。

附 录 A
（资料性附录）
指示植物嫁接检测

A.1 嫁接方法

A.1.1 绿枝嫁接

上年培育盆栽指示植物或待检样品的扦插生根苗，翌年5月～6月，当砧木和接穗均达半木质化时开始嫁接。嫁接时，砧木留3片～4片叶平剪，抹除夏芽及副梢，从断面中间垂直劈一个2.5 cm～3.0 cm长的切口；选择与砧木粗度和成熟度相近的待检样品或指示植物作为接穗，抹除接穗上的夏芽或剪去萌发的副梢，在芽下方0.5 cm左右，从芽两侧向下削成长2.5 cm～3.0 cm长的平滑斜面，呈楔形；削好的接穗马上插入砧木的切口中，使二者形成层对齐，接穗斜面露白0.5 mm，用1.0 cm～1.2 cm宽的薄塑料条，从砧木接口下边向上缠绕，只将接芽露出，一直缠到接穗顶端，封严接穗上的所有切口后再回缠打个活结。如果绿枝嫁接时间较早，气温偏低，可套小塑料袋增温、保湿，以提高成活率。

A.1.2 硬枝嫁接

早春萌芽前，以上年培育的盆栽指示植物或待检样品做砧木，剪留10 cm～15 cm长，用切接刀在砧木中心垂直向下劈2.5 cm～3.0 cm长的切口；选择与砧木粗度相近的接穗，用清水浸泡24 h后剪截，接穗上端距芽眼约1.5 cm处平剪，再用切接刀在接穗芽下0.5 cm～1 cm处，从芽两侧向下削成长2.5 cm～3.0 cm长的平滑斜面，呈楔形；将削好的接穗一边的形成层与砧木形成层对齐插入砧木的切口内，接穗削面在砧木劈口上露出1 mm～2 mm。然后用塑料条从砧木切口的下方向上螺旋式缠绕，将接口缠紧封严。

A.2 嫁接数量与对照

检测时，须设阴、阳对照；同一指示植物与同一个样品组合（包括阴、阳对照）嫁接3株～5株。

A.3 嫁接后的管理

嫁接后的盆苗置于防虫温室中，温度控制在20℃～26℃，并及时浇水、除去砧木上萌发的新梢，以促进接芽萌发。嫁接成活后，加强肥水管理和病虫害防治。待指示植物长出嫩叶后，于生长季节定期观察，并记载症状表现。有的病毒病在第2年才开始表现症状，因此，至少观察2年。由于病毒症状表现受温度、指示植物生长状态和病毒浓度等多种因素的影响，有必要在生长季节进行多次调查，以保证鉴定结果准确可靠。

A.4 结果判断

嫁接组合中，只要有1株表现典型症状（表A.1），即判定该样品携带相应的葡萄病毒。

表A.1 葡萄病毒指示植物及症状表现

病毒种类	指示植物	症状表现
葡萄扇叶病毒	沙地葡萄圣乔治（*Vitis rupestris* cv. St. Gorge）	叶片出现褪绿斑点、扇形叶
葡萄卷叶相关病毒	欧亚种葡萄（*Vitis vinifera*）	叶缘向下反卷，叶脉间变红
葡萄病毒A	Kober 5BB	木质部产生茎沟槽，叶片黄斑

表 A.1（续）

病毒种类	指示植物	症状表现
葡萄斑点病毒	沙地葡萄圣乔治(*Vitis rupestris* cv. St. Gorge)	叶脉透明
* 指红色品种，常用的有品丽珠（Cabernet franc）、赤霞珠（Cabernet sauvignon）、黑比诺（Pinot noir）、梅森（Mission）、巴贝拉（Barbera）等。		

附 录 B
（资料性附录）
ELISA 和 RT-PCR 检测适宜取样时期和部位

ELISA 和 RT-PCR 检测适宜取样时期和部位见表 B.1。

表 B.1 ELISA 和 RT-PCR 检测适宜取样时期和部位

病毒种类	ELISA 检测		RT-PCR 检测	
	适宜时期	取样部位	适宜时期	取样部位
葡萄扇叶病毒	新梢生长期	嫩叶	新梢生长期	嫩叶
葡萄卷叶相关病毒 1，葡萄卷叶相关病毒 2，葡萄卷叶相关病毒 3，葡萄卷叶相关病毒 4，葡萄卷叶相关病毒 5，葡萄卷叶相关病毒 7	休眠期	成熟枝条韧皮部	休眠期	成熟枝条韧皮部
葡萄病毒 A	休眠期	成熟枝条韧皮部	休眠期	成熟枝条韧皮部
葡萄病毒 B	休眠期	成熟枝条韧皮部	休眠期	成熟枝条韧皮部
葡萄斑点病毒	休眠期	成熟枝条韧皮部	休眠期	成熟枝条韧皮部

附 录 C
（资料性附录）
酶联免疫吸附检测（ELISA）

C.1 仪器设备和用具

C.1.1 仪器设备

酶标仪、电子天平（感量 0.000 1 g）、冰箱、恒温箱（0℃～50℃）、酸度计、离心机。

C.1.2 用具

可调式移液器（2 μL、10 μL、100 μL、200 μL、1 000 μL）及相应的吸头、酶标板、离心管、研钵等。

C.2 试剂

C.2.1 包被缓冲液（0.05 mol/L 碳酸盐缓冲液，pH9.6）

Na_2CO_3	1.59 g
$NaHCO_3$	2.93 g

溶于 900 mL 蒸馏水中，搅拌至完全溶解，调节 pH 至 9.6，定容至 1 000 mL。

C.2.2 冲洗缓冲液（PBST，pH7.4）

$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$	5.802 g
$NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$	0.592 g
NaCl	8.766 g
Tween－20	0.5 mL

溶于 900 mL 蒸馏水中，搅拌至完全溶解，调节 pH 至 7.4，定容至 1 000 mL。

C.2.3 样品提取缓冲液（不同抗血清，提取缓冲液不同，应根据血清试剂盒说明配制）

聚乙烯吡咯烷酮（PVP）	2.0 g

溶于 100 mL 冲洗缓冲液（C.2.2）。

C.2.4 酶标抗体缓冲液（不同抗血清，提取缓冲液不同，应根据血清试剂盒说明配制）

聚乙烯吡咯烷酮（PVP）	2.0 g
牛血清白蛋白（BSA）	0.2 g

溶于 100 mL 冲洗缓冲液（C.2.2）。

C.2.5 底物缓冲液（pH9.8）

二乙醇胺	9.7 mL

定容至 100 mL，用 6 mol/L HCl 调 pH 至 9.8。

C.2.6 底物（现用现配）

在 10 mL 底物缓冲液（C.2.4）中加 10 mg 对硝基苯磷酸二钠盐（PNPP）。

C.2.7 终止液（1 mol/L NaOH）

NaOH	4 g

先用少量蒸馏水溶解后，定容至 100 mL。

注：所用试剂均为分析纯，酶标抗体为碱性磷酸酶标记的抗体。

C.3 检测

C.3.1 加抗血清

用包被缓冲液(C.2.1)将病毒特异抗血清 IgG 稀释至工作浓度，加入到酶标板的微孔中，每孔 100 μL，通常在 37℃保温 2 h(不同抗血清，保温时间和温度不同，应根据血清试剂盒说明确定)，用 PBST (C.2.2)洗板 3 次～4 次。

C.3.2 加抗原样品

根据检测病毒种类，取嫩叶或一年生休眠枝条韧皮部，每 1 g 样品加入 5 mL～10 mL 样品提取缓冲液(C.2.3)，研磨后，3 000 r/min 离心 5 min。每个微孔板需同时设阳性、阴性和空白对照，对照和每个样品分别加 2 个微孔，每个微孔加 100 μL 上清液。4℃冰箱中放置过夜后，按 C.3.1 方法洗板。

C.3.3 加酶标抗体

用酶标抗体缓冲液(C.2.4)将碱性磷酸酶标记的特异抗血清 IgG 稀释至工作浓度，加入到微孔中，每孔 100 μL，按 C.3.1 保温和洗板。

C.3.4 加底物

每个微孔加 100 μL 底物(C.2.5)，黑暗中室温放置 15 min～30 min。

C.3.5 终止反应

每个微孔加 25 μL 终止液。

C.3.6 结果判定

测定酶标板各微孔 405 nm 吸光值。若待检样品 2 孔平均吸光值/阴性对照 2 孔平均吸光值≥2，则判定该样品为阳性；如果样品 2 孔平均吸光值/阴性对照 2 孔平均吸光值<2，则判定该样品为阴性。

附 录 D
（资料性附录）
RT-PCR 检测

D.1 仪器设备和材料

D.1.1 微量移液器：200 μL～1 000 μL、20 μL～200 μL、10 μL～100 μL、0.5 μL～10 μL。

D.1.2 电子天平：感量为 0.01 g 和 0.000 1 g。

D.1.3 高速冷冻离心机。

D.1.4 PCR 仪。

D.1.5 水平凝胶电泳仪。

D.1.6 凝胶成像系统。

D.1.7 DEPC 水处理的吸头和离心管。

D.2 试剂

D.2.1 研磨缓冲液

4.0 mol/L 硫氰酸胍	23.6 g
0.2 mol/L NaAC	0.82 g
25 mmol/L EDTA	0.365 g
1.0 M KAC	4.9 g
2.5% PVP-30	1.25 g

DEPC 处理水定容至 50 mL，4℃保存。使用前加入 2%偏重亚硫酸钠。

D.2.2 清洗缓冲液

10.0 mmol/L Tris-HCl	0.394 1 g
0.5 mmol/L EDTA	0.036 5 g
50 mmol/L NaCl	0.730 5 g
50% 乙醇	125 mL

DEPC 处理水定容至 250 mL，4℃贮存。

D.2.3 50×TAE 缓冲液

Tris	60.5 g
冰乙酸	13.5 mL（或 37.5 mL 36%乙酸）
EDTA	2.3 g

灭菌蒸馏水定容至 250 mL，pH 为 8.0。

D.2.4 6×凝胶加样缓冲液

溴酚蓝	0.125 g
二甲苯青 FF	0.125 g

40%(*W*/*V*)蔗糖水溶液

灭菌蒸馏水定容至 50 mL，4℃冰箱保存。

D.3 检测

D.3.1 总 RNA 提取

采用二氧化硅吸附法提取总 RNA：

a) 称取 100 mg 待检材料放入塑料袋中，加入 1 mL 研磨缓冲液磨碎；

b) 取 500 μL 匀浆置于 1.5 mL 消毒离心管中（预先加入 150 μL 10% N-lauroylsarcosine），70℃保温 10 min、冰中放置 5 min 后，14 000 r/min 离心 10 min；

c) 取 300 μL 上清液，加入 150 μL 100%乙醇、300 μL 6 mol/L 碘化钠、30 μL 10%硅悬浮液（pH2.0），室温下振荡 20 min；

d) 6 000 r/min 离心 1 min，弃去上清，加入 500 μL 清洗缓冲液重悬浮沉淀，6 000 r/min 离心 1 min；

e) 重复步骤 d)；

f) 将离心管反扣在纸巾上，室温下自然干燥后，重新悬浮于无 RNase 和 DNase 的水中，70℃保温 4 min；

g) 13 000 r/min 离心 3 min，取上清液，保存于－70℃超低温冰箱中。也可采用商品性试剂盒或其他方法提取总 RNA。

D.3.2 合成 cDNA

5 μL 总 RNA 与 1 μL 0.1 μg/μL 随机引物 5'd（NNN NNN）3'和 9 μL 水混合，95℃变性 5 min 后立即置于冰中冷却 2 min。再加入含 5 μL 5×MMLV-RT 缓冲液、1.25 μL 10 mmol/L dNTPs、0.5 μL 200 U/μL M-MLV 逆转录酶和 3.25 μL 灭菌纯水的逆转录混合液，经 37℃ 10 min、42℃ 50 min、70℃ 5 min 合成 cDNA。

D.3.3 PCR 扩增

PCR 反应混合液共 25 μL，包括 2.5 μL cDNA、2.5 μL 10×PCR 缓冲液、0.5 μL 10 mmol/L dNTPs、0.5 μL 10 μmol/L 正向和反向引物（表 D.1）、0.375 μL 2 U/μL *Taq* DNA 聚合酶、18.125 μL 灭菌纯水。按如下程序进行 PCR 扩增：94℃ 10 min；94℃ 30 s，退火（退火温度见表 D.1）45 s，72℃50 s 共 35 个循环，最后 72℃ 延伸 10 min。根据各组引物的退火温度及扩增产物大小设计。

D.3.4 结果判定

检测时设阴性、阳性对照，采用 1.5%琼脂糖凝胶电泳，180 v 电泳约 30 min，0.5 μg/mL EB 溶液染色 10 min ～15 min，观察到与阳性对照位置相同的目的条带的样品为阳性，携带所检病毒；与阴性对照一样，未观察到目的条带的样品为阴性，不携带所检病毒。

表 D.1 葡萄病毒 RT-PCR 引物

病毒名称	引物序列（5'-3'）	退火温度（℃）	产物（bp）
葡萄扇叶病毒（GFLV）	P1：CCAAAGTTGGTTTCCCAAGA P2：ACCGGATTGACGTGGGTGAT	56	605
葡萄卷叶相关病毒 1（GLRaV-1）	P1：TCTTTACCAACCCCGAGATGAA P2：GTGTCTGGTGACGTGCTAAACG	54	232
葡萄卷叶相关病毒 2（GLRaV-2）	P1：TTGACAGCAGCCGATTAAGCG P2：CTGACATTATTGGTGCGACGG	51	333
葡萄卷叶相关病毒 3（GLRaV-3）	P1：CGCTAGGGCTGTGGAAGTATT P2：GTTGTCCCGGGTACCAGATAT	52	546
葡萄卷叶相关病毒 4（GLRaV-4）	P1：CTCAAACCAGCGGCTGTTG P2：GTGATACCATATACATACCGACC	54	441
葡萄卷叶相关病毒 5（GLRaV-5）	P1：CCCGTGATACAAGGTAGGACA P2：CAGACTTCACCTCCTGTTAC	54	690

表 D.1（续）

病毒名称	引物序列(5′-3′)	退火温度(℃)	产物(bp)
葡萄卷叶相关病毒 7(GLRaV-7)	P1：TATATCCCAACGGAGATGGC P2：ATGTTCCTCCACCAAAATCG	52	502
葡萄病毒 A(GVA)	P1：AAGCCTGACCTAGTCATCTTGG P2：GACAAATGGCACACTACG	52	430
葡萄病毒 B(GVB)	P1：ATCAGCAAACACGCTTGAACCG P2：GTGCTAAGAACGTCTTCACAGC	55	450
葡萄斑点病毒(GFkV)	P1：GTCCTCCTACACCTCCCTGTCCAT P2：CCTCATCCGCGGAGTTATCGAAT	60	412
沙地葡萄茎痘病毒(GRSPaV)	P1：GGCCAAGGTTCAGTTTG P2：ACACCTGCTGTGAAAGC	50	498