B 15

NY

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 402—2000

脱毒甘薯种薯(苗)病毒检测技术规程

Rules for virus detection of virus-free seed (seedling) sweet potatoes

2000-09-22 发布　　2000-12-01 实施

中华人民共和国农业部　发布

前　言

为了有效地实施对脱毒甘薯种薯(苗)质量检验和管理，规范脱毒甘薯种薯(苗)市场，促进甘薯脱毒技术推广，实现脱毒甘薯种薯(苗)病毒检测的规范化、标准化，特制定本规程。本规程在参照国内外甘薯病毒检测技术最新研究进展的基础上，结合当前国内生产实际，力求达到快速、准确、可操作性强的检测要求。检测对象主要选择生产上发生分布范围广、危害性大的病毒。检测方法主要采用指示植物检测和斑点酶联免疫吸附检测方法。

本规程内容包括脱毒甘薯种薯(苗)病毒检测的适用范围、检测对象、抽样方法、检测方法和质量要求。

本标准的附录 A、附录 B 都是标准的附录。

本标准由中华人民共和国农业部提出。

本标准主要起草单位：农业部植物脱毒种苗质量监督检验测试中心(济南)、山东省植物保护总站。

本标准主要起草人：孙作文、商明清、李明立、刘敬东、杨勤民、任宝珍。

中华人民共和国农业行业标准

脱毒甘薯种薯(苗)病毒检测技术规程

NY/T 402—2000

Rules for virus detection of virus-free seed (seedling) sweet potatoes

1 范围

本标准规定了脱毒甘薯种薯(苗)的病毒检测方法和操作规程。

本标准适用于脱毒甘薯种薯(苗)的病毒检测。

2 定义

本标准采用下列定义。

2.1 脱毒苗

应用茎尖组织培养技术获得的再生试管苗,经检测确认不带甘薯羽状斑驳病毒(SPFMV)和甘薯潜隐病毒(SPLV),才确认是脱毒苗。

2.2 脱毒种薯(苗)

从繁殖脱毒苗开始,经逐代繁殖增加种薯(苗)数量的种薯(苗)生产体系生产出来的。分原原种、原种、生产用种三个级别。

2.2.1 原原种 pre-elite

用脱毒苗在防虫网室、温室条件下生产的符合质量标准的种薯(苗)。

2.2.2 原种 elite

用原原种作种薯,在良好隔离条件下生产出的符合质量标准的种薯(苗)。

2.2.3 生产用种 certified seed or seedling

用原种作种薯,在隔离条件下生产出的符合质量标准的种薯(苗)。

2.3 病毒病株允许率

指各级甘薯种薯(苗)繁殖田中病毒病株的允许比率。

3 检测对象

甘薯羽状斑驳病毒(Sweet potato feathery mottle virus,SPFMV);

甘薯潜隐病毒(Sweet potato latent virus,SPLV)。

4 抽样

4.1 组培苗抽样

4.1.1 脱毒核心材料:每株必须检测。

4.1.2 扩繁苗:随机抽取1%～2%的扩繁苗检测。

4.2 田间抽样

4.2.1 原原种和原种抽样:定植后30天、60天、收获前2周,在目测全田的基础上,采用五点取样法,

中华人民共和国农业部2000-09-22批准　　2000-12-01实施

抽样数量为 0.1 hm^2 以下 200 株；0.11～1 hm^2 500 株；超出 1 hm^2 面积，划出另一检验区，按本规程规定的面积取样。每株取上、中、下部叶片 1～5 g，低温保湿存放，24 h 内检测。

4.2.2 生产用种抽样：定植后 30 天、收获前两周，在目测的基础上，采用随机取样法，0.1 hm^2 以下检验 2 点，每点 100 株；0.11～1 hm^2 检验五点，每点 100 株；1.1～5 hm^2 检验 10 点，每点 100 株；超出 5 hm^2 面积，划出另一检验区，按本规程规定的面积取样。取样方法及样品保存同 4.2.1。

4.3 商品种薯(苗)抽样

没有经过田间检验的种薯(苗)必须进行块根或种苗检验。

4.3.1 根据甘薯种薯(苗)不同存放方式，采用分层设点取样或随机取样，抽样数量见表 1。

表 1 抽样数量标准表

种 类	种薯(苗)总量	抽样百分率，%	抽样最低数量
薯苗	≤10 000 株	6～10	100 株
	>10 000 株	3～5	
种薯	≤10 000 kg	6～10	100 kg
	>10 000 kg	3～5	
注：不足抽样最低数量的全部作为混合样品。			

4.3.2 将第一次抽取的样品混合后，进行二次抽样，随机抽取 10%的混合样品检测。

5 检测方法

5.1 斑点酶联免疫吸附(Dot-ELISA)检测法

用于检测甘薯羽状斑驳病毒和甘薯潜隐病毒，检测方法见附录 A。

5.2 指示植物检测法

用于辅助检测甘薯羽状斑驳病毒和甘薯潜隐病毒，检测方法见附录 B。

检测甘薯病毒的指示植物及症状见表 2。

表 2 检测甘薯病毒的指示植物及症状

病 毒 种 类	指 示 植 物	症 状
SPFMV	巴西牵牛	羽状斑驳
SPLV	巴西牵牛	叶脉变黄

6 质量要求

凡斑点酶联免疫吸附检测或指示植物检测呈阳性者为带毒薯(苗)。

原原种：病毒病株允许率是 0。

原种：病毒病株允许率≤2.0%。

生产用种：病毒病株允许率≤10%。

附 录 A
（标准的附录）
斑点酶联免疫检测法

A1 溶液配制

所用化学试剂为分析纯级规格，用水为蒸馏水。

A1.1 三羟甲基氨基甲烷(TBS)(pH7.5)

Tris Base	4.84 g
氯化钠(NaCl)	58.44 g
叠氮钠(NaN_3)	0.40 g

溶于 1 990 mL 蒸馏水中，用盐酸(37%)调 pH 至 7.5，定容至 2 000 mL。

A1.2 洗涤缓冲液(TTBS)

1.0 mL 吐温-20(Tween-20)溶于 2 000 mL TBS 中。

A1.3 抽提缓冲液

亚硫酸钠(Na_2SO_3)0.20 g 溶于 TBS 中，定容至 100 mL。

A1.4 封闭缓冲液(现用现配)

脱脂奶粉	0.50 g
辛通 X-100(Triton X-100)	0.5 mL
TBS	25 mL

先将脱脂奶粉溶解于少量 TBS 中，再用 TBS 定容至 25 mL。加入 Triton X-100 混合均匀。

A1.5 抗体稀释缓冲液

脱脂奶粉	1.00 g
TBS	50 mL

先将脱脂奶粉溶解于少量 TBS 中，再用 TBS 定容至 50 mL。

A1.6 底物缓冲液(pH9.5)

Tris Base	6.05 g
氯化钠(NaCl)	2.92 g
氯化镁($MgCl_2 \cdot 6H_2O$)	0.51 g
叠氮钠(NaN_3)	0.05 g

溶于 450 mL 蒸馏水中，用浓盐酸调 pH 值至 9.5，定容至 500 mL。

A1.7 硝基蓝四唑盐(NBT)和 5-溴-4-氯-3-吲哚磷酸酯(BCIP)储备液

NBT 储备液：

NBT	0.04 g
70%N,N-二甲基甲酰胺	1.2 mL

混合均匀，4℃避光保存。

BCIP 储备液：

BCIP	0.02 g
70%N,N-二甲基甲酰胺	1.2 mL

混合均匀，4℃避光保存。

A1.8 底物溶液(现用现配)

底物缓冲液	25 mL

NBT 储备液　　75 μL

BCIP 储备液　　75 μL

先将 NBT 储备液溶于 25 mL 底物缓冲液中，再逐滴加入 BCIP 储备液，边加边振摇混匀。

A2 样品制备

将待测叶片用清水清洗干净，从每一样品叶片上各取一直径约 1 cm 圆片，放入样品袋中，加入 3 mL抽提缓冲液充分研磨，4℃静置 30～40 min，取澄清汁液点样。样品为块根时催芽处理后取幼芽、叶制样。

A3 操作步骤

A3.1 点样：将打好方格的硝化纤维素膜用 TBS 缓冲液处理后放在洁净的滤纸上，每个样品各吸取 17 μL上清液滴在膜上方格的正中，干燥 15～30 min。同时设阳性、阴性和空白对照，可根据需要设置重复。

A3.2 封闭：将干燥后的膜浸泡在封闭缓冲液中，室温下摇床振荡(50 r/min)1 h。

A3.3 孵育第一抗体：将膜置于用抗体缓冲液稀释至工作浓度的抗血清中，室温下摇床振荡(50 r/min)过夜。

A3.4 洗涤：用洗涤缓冲液洗膜 3 次，每次摇床振荡(100 r/min)3 min。

A3.5 孵育第二抗体：将膜置于用抗体缓冲液稀释至工作浓度的酶标抗体中，室温下摇床振荡(50 r/min)1 h。

A3.6 洗涤：洗涤 4 次，方法同 A3.4。

A3.7 显色：将膜置于 NBT/BCIP 底物溶液中，室温下摇床振荡(50 r/min)孵育 30 min。

A3.8 终止反应：弃去底物溶液并用蒸馏水洗膜 3 次，每次摇床振荡(100 r/min)3 min。

A3.9 阳性判断：晾干后观察颜色反应，出现蓝紫色颜色反应的样品为阳性。

附 录 B
（标准的附录）
指示植物检测法

B1 繁育指示植物

在防虫条件下盆栽巴西牵牛，至1～2片真叶时嫁接。

B2 嫁接

以待测样品的茎蔓为接穗，巴西牵牛为砧木，在巴西牵牛的茎部（子叶以下）斜切。将待检样品茎蔓切成3～5段，每段带有至少一个腋芽，去叶后将底端削成楔型，插入砧木的切口内，用封口膜扎紧，置26～32℃防虫网室内遮荫保湿2～3天。每个样品重复3～5次。同时设阳性对照、阴性对照。嫁接10～15天后观察记载症状。

B3 阳性判断

根据指示植物症状，确定病毒有无及种类。在所有嫁接的指示植物中只要有一株表现典型症状，该样品即为阳性。